



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EXPRESIÓN DE LOS GENES HSP70 COMO RESPUESTA
AL ESTRÉS TÉRMICO EN LA MARIPOSA TROPICAL
*Heliconius erato***

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: Leo Tomás Camino Cedeño

TUTOR: PhD. Caroline Oriana Bacquet Pérez

Napo – Ecuador

2022

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Leo Tomás Camino Cedeño, con documento de identidad N° 1723829246, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniería en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 25 de noviembre de 2022



Leo Tomás Camino Cedeño
1723829246

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Leo Tomás Camino Cedeño, con documento de identidad N° 1723829246, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Expresión del gen *Hsp70* como respuesta al estrés térmico en la mariposa tropical *Heliconius erato*”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 25 de noviembre de 2022



Leo Tomás Camino Cedeño
1723829246

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Expresión del gen *Hsp70* como respuesta al estrés térmico en la mariposa tropical *Heliconius erato*”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Leo Tomás Camino Cedeño bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 25 de noviembre de 2022

Firma:



Caroline Nicole Oriana Bacquet Pérez

C.I: 1756516041

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las hermosas comunidades de Atacapi, Muyuna, Tena y Alto Tena por haberme aceptado como uno más de ustedes y haberme mostrado siempre un trato cariñoso y amable. La Amazonía se ha convertido en mi nuevo hogar gracias a todos ustedes.

Me gustaría presentar mi infinito agradecimiento a la Dra. Caroline Bacquet por su excelsa labor como docente, tutora de tesis y mentora. Cada pequeño y gran aporte han sido fundamentales para llegar hasta este punto. Lin, gracias por apoyarme en momentos difíciles y motivarme en situaciones que enfrenté dificultades. Eres una persona que me inspira a seguir amando la ciencia y ayudar a los demás. Siempre recordaré todas tus generosas acciones y tus imprescindibles enseñanzas, pues tienen un espacio especial en mi corazón.

Durante el camino que inicié en 2016 he sido impulsado por grandiosas mentes que sembraron en mí invaluable conocimientos y saberes. A todos mis amados profesores y profesoras les presento mi más sincero agradecimiento por toda la paciencia, dedicación y humildad. Espero algún día generar en alguien más toda la motivación e inspiración que ustedes generaron en mí. A Giovanna Morán y Kathy Apunte, muchas gracias por sus enseñanzas y supervisión como técnicas de laboratorio.

Al equipo de investigación de *Heliconius* de Ikiam. Gracias por todo su aporte e interés en mi trabajo de titulación, principalmente a Leny Tacuri por permitirme continuar con esta increíble investigación y a Shane Wright, por todas sus enseñanzas en torno al manejo de datos y estadística multifactorial.

A mi novia Yani y mis compañeros Karen, Ángel, Alberto y Pablito. Gracias por ser mi nueva familia y apoyarme durante todo este camino. Ustedes son pilares fundamentales en mi vida y jamás serán suficientes las palabras para expresar mi gratitud.

A mis amados padres quiero agradecerles por su esfuerzo, tenacidad y resiliencia, que es la mayor de mis inspiraciones. Gracias por amarme desde antes de llegar a este mundo y por siempre construir la mejor versión posible de Leo. Gracias por haber antepuesto mi felicidad antes que la suya. Gracias por ser tan grandes.

DEDICATORIA

*A mi amada madre, Viviana,
Por dedicar toda su vida a verme sonreír una vez más*

*A la memoria de mi abuelita, Eloísa,
Por enseñarme a aprender*

TABLA DE CONTENIDO

CARÁTULA	
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Cambio climático.....	1
1.1.2 Regulación térmica en insectos ectotermos	1
1.1.3 Proteínas de shock térmico	2
1.1.4 Expresión genética inducible de Hsp70.....	2
1.2 Planteamiento del problema.....	2
1.3 Justificación de la investigación.....	3
1.4 Objetivos de la investigación	4
1.4.1 Objetivo general	4
1.4.2 Objetivos específicos.....	4
CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	4
2.1 Identificación de genes Hsp70 y genes endógenos en <i>Heliconius erato</i>	4
2.2 Diseño de cebadores	5
2.3 Preparación y recolección de mariposas <i>Heliconius erato</i>	6
2.3.1 Recolección en campo de especímenes parentales	6
2.3.2 Apareamiento y desove	6
2.3.3 Cuidado de ejemplares	6

2.4 Pruebas de estrés térmico.....	7
2.4.1 Tratamiento de temperatura con condiciones térmicas elevadas	7
2.4.2 Tratamiento de temperatura con condiciones térmicas bajas	7
2.4.3 Tratamiento de temperatura con condiciones térmicas convencionales	8
2.5 Extracción de ARN total	8
2.5.1 Extracción de ARN total de <i>H. erato</i>	8
2.5.2 Cuantificación de concentraciones de ARN por espectrofotometría	9
2.5.3 Estandarización de concentraciones de ARN	9
2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	9
2.6.1 Síntesis de ADN complementario.....	9
2.6.2 Estandarización de perfiles térmicos por PCR.....	10
2.6.3 Visualización de productos PCR por electroforesis en gel	11
2.7 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	11
2.7.1 Extracción de ADN genómico de <i>H. erato</i>	11
2.7.2 Curvas de calibración de cebadores de genes de interés y endógenos	12
2.7.3 Cálculo de eficiencia de qPCR.....	12
2.7.4 Validación de cebadores por curvas de melting	13
2.7.5 PCR en tiempo real de genes <i>Hsp70</i> y endógenos	13
2.8 Transformación de datos de RT-qPCR y análisis estadísticos.....	14
2.8.1 Cuantificación absoluta por curvas de calibración.....	14
2.8.2 ANOVA factorial del gen endógeno	14
2.8.3 Cuantificación relativa por método de $\Delta\Delta CT$	14
2.8.4 Modelos lineales generalizados	15
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	16
3.1 Identificación de genes <i>Hsp70</i> y endógenos en <i>Heliconius erato</i>	16
3.2 Cebadores	17
3.3 Cuantificación de ARN.....	18
3.4 Validación del gen endógeno GAPDH por ANOVA factorial	18
3.5 Cuantificación absoluta.....	19
3.6 Cuantificación relativa de genes <i>HSP70</i>	20
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	23
4.1 Diseño experimental	23
4.1.1 Factores experimentales.....	23
4.1.2 Genes de referencia	23
4.2 Cebadores	24
4.2.1 Análisis BLAST.....	24

4.2.2 Especificidad de cebadores.....	25
4.3 Material genético.....	25
4.3.1 Integridad del material genético.....	25
4.3.2 Transcripción reversa.....	26
4.4 Cuantificación absoluta de copias de ADN.....	26
4.4.1 Validación genes endógenos.....	27
4.5 Cuantificación relativa de expresión génica.....	27
4.5.1 Eficiencia de amplificación.....	27
4.5.2 Expresión de genes <i>Hsp70</i> en otros estudios.....	28
4.5.3 Variabilidad de la expresión en réplicas biológicas.....	28
4.5.4 Modelos lineales generalizados.....	29
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los cebadores diseñados tras la identificación por BLAST.....	5
Tabla 2. Cantidad de reactivo utilizada en una reacción individual de PCR.....	11
Tabla 3. Cantidad de reactivo utilizada en una reacción individual de RT-qPCR.....	13
Tabla 4. Resultados obtenidos de análisis BLAST en la base de datos Lepbase.....	16
Tabla 5. Estimaciones paramétricas de modelos lineales generalizados en la variación de expresión génica de <i>H. erato</i>	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de calibración de cebadores con 4 series de dilución.....	18
Figura 2. Expresión génica relativa del gen <i>Hsp70A</i>	20
Figura 3. Expresión génica relativa del gen <i>Hsp70B1</i>	21
Figura 4. Expresión génica relativa del gen <i>Hsp70B2</i>	21

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Gel de electroforesis de productos PCR de cebadores HSP70 A.
- Anexo 2.** Gel de electroforesis de productos PCR de cebadores HSP70 B1 del par 2.
- Anexo 3.** Gel de electroforesis de productos PCR de cebadores HSP70 B2 del par 2.
- Anexo 4.** Gel de electroforesis de productos amplificados por PCR del gen de Actina.
- Anexo 5.** Gel de electroforesis de productos amplificados por PCR del gen GAPDH.
- Anexo 6.** Gel de electroforesis. A la izquierda RSP3A y a la derecha eEF1 alfa.
- Anexo 7.** Especificidad cuantificada en *Primer BLAST* para el par 2 de GAPDH.
- Anexo 8.** Especificidad cuantificada en *Primer BLAST* para EEF1A.
- Anexo 9.** Curvas de calibración y de melting de los cebadores.
- Anexo 10.** Cuantificación de concentraciones de ARN de *H. erato*.
- Anexo 11.** Gráfica Q-Q de valores residuales de CT de GAPDH.
- Anexo 12.** Ciclos de umbral de GAPDH con factores tratamiento, sexo y tagma (3x3x2).
- Anexo 13.** Resultados del ANOVA factorial (3x3x2) de CT de GAPDH.
- Anexo 14.** Ciclos de umbral de GAPDH con factores tratamiento y sexo (3x2)
- Anexo 15.** Resultados del ANOVA factorial (3x2) de CT de GAPDH excluyendo tagma.
- Anexo 16.** Cuantificación absoluta del gen endógeno *GAPDH*.
- Anexo 17.** Cuantificación absoluta del *Hs70 A*
- Anexo 18.** Cuantificación absoluta del *Hsp70 B1*.
- Anexo 19.** Cuantificación absoluta del *Hsp70 B2*.
- Anexo 20.** Resultados de RT-qPCR para la cuantificación de genes *hsp70*. Naranja: GAPDH, Púrpura: *Hsp70 A*, Verde: *Hsp70 B1*, Azul: *Hsp70 B2*.

RESUMEN

El cambio climático ha incrementado la variabilidad de la temperatura global en las últimas décadas. La inestabilidad en la climatología representa un desafío para la conservación de la biodiversidad global. Un mecanismo genético para combatir el estrés térmico es la inducción de proteínas de shock térmico. *Heliconius erato* es una mariposa del neotrópico que ha sido ampliamente estudiada. Se ha demostrado que este organismo modelo se ve influenciado por las alteraciones climáticas. En este estudio se cuantificó la expresión génica de los genes de la familia de proteínas de shock térmico de 70 kDa (Hsp70) de un único exón de *H. erato* a través de RT-qPCR por el método de $\Delta\Delta CT$. Los genes *Hsp70A*, *Hsp70B1* y *Hsp70B2* fueron identificados por BLAST de secuencias. La expresión génica fue analizada en tejidos de cabeza, tórax y abdomen, donde se observó que el shock térmico causado a 40°C indujo alta sobreexpresión, mientras que el shock a 4°C indujo una ligera sobreexpresión en los tres genes estudiados. Las muestras provenientes del tórax de las mariposas presentaron la mayor sobreexpresión entre las tagmas. Las hembras mostraron un amplio incremento en la expresión del gen *Hsp70A* respecto a los machos, mientras que los resultados fueron similares para ambos sexos en los genes *Hsp70B1* y *B2*. A través de modelos lineales generalizados se analizó la influencia de los factores en la expresión génica relativa, evidenciándose que el tratamiento térmico, la tagma de origen de la muestra y el sexo de la mariposa tuvieron impacto significativo en la expresión de los genes estudiados. Este estudio revela los efectos del shock térmico por calor y frío en mariposas *H. erato* y provee información valiosa para la comprensión de los impactos epigenéticos en mariposas del neotrópico que podrían producirse por efecto del cambio climático.

Palabras clave: Mariposa, almendra común, *Heliconius*, *Hsp70*, expresión génica

ABSTRACT

Climate change has increased the variability of global temperatures over the last decades. The unpredictability of climatology represents a challenge for global biodiversity conservation. Heat shock proteins are a family of chaperon proteins that stabilize and prevent denaturation. The induction of heat shock proteins is a genetic mechanism to face thermal stress. *Heliconius erato* is an autochthonous Neotropics butterfly inhabiting rainforests that have been widely studied during the last century. It has been shown that *H. erato* is influenced by climate alterations. Nevertheless, information about epigenetic mechanisms is still unresolved. For the first time, we quantified the gene expression of single-exon genes of the Heat Shock Protein family of 70 kDa (*Hsp70*) of *H. erato* through RT-qPCR and $\Delta\Delta CT$ at different temperatures. We identified three single-exon genes using Nucleotide BLAST: *Hsp70A*, *Hsp70B1*, and *Hsp70B2*. Gene expression was analyzed from the head, thorax, and abdomen sections. Heat shock at 40°C resulted in significant overexpression of all genes, whereas cold shock at 4°C resulted in slight overexpression. Thorax showed higher overexpression among all tagmata. Female samples had higher expression of *Hsp70A* compared to males, while *Hsp70B1* and *Hsp70B2* had no significant differences between the sexes. We used generalized linear models to analyze the influence of the three factors on the relative gene expression of the *Hsp70* family. We found that variability in relative gene expression was highly influenced by thermal treatment, tagmata, and sex. This study reveals the effects of heat and cold thermal shock in the *H. erato* butterfly and provides valuable information to comprehend the epigenetic impacts caused by climate change in the Neotropical butterflies.

Palabras clave: Butterfly, red postman, *Heliconius*, *Hsp70*, gene expression

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cambio climático

Los ecosistemas con climatología cambiante han desafiado a los organismos por milenios, afectando su fisiología y reproducción [1,2]. Durante los últimos 450 millones de años ocurrieron cinco extinciones masivas por alteraciones en la temperatura global [2]. Se ha demostrado que las perturbaciones ambientales amenazan la biodiversidad por la correlación positiva entre alteraciones térmicas y tasas de extinción [2,3]. Por ello, la modificación acelerada de la temperatura global podría provocar extinciones masivas, afectando principalmente a los organismos incapaces de regular su propia temperatura corporal [4]. Ese es el caso de los insectos, que por su tamaño reducido y ectotermia son más vulnerables a eventos de fluctuación térmica [4,5]. No obstante, los insectos poseen mecanismos fisiológicos para enfrentar los desafíos de las alteraciones climáticas [5].

1.1.2 Regulación térmica en insectos ectotermos

La mayoría de los insectos son incapaces de regular su temperatura corporal como lo hacen otros animales [5]. A pesar de ello, sus actividades metabólicas y fisiológicas están estrechamente relacionadas con su temperatura corporal [1,4,5]. Para mantener la homeostasis necesitan una exposición térmica adecuada [6] ya que las temperaturas extremas alteran sus funciones vitales y aumentan su mortalidad [7]. Sin embargo, se ha demostrado que el estrés térmico en insectos desencadena la síntesis de proteínas especializadas para alcanzar la homeostasis [8,9]. El mecanismo más importante de tolerancia térmica en insectos es la expresión de proteínas de shock térmico (HSP) [9–14]. Estas proteínas se asocian con la supervivencia histórica de ectotermos frente a alteraciones térmicas globales [15,16].

1.1.3 Proteínas de shock térmico

Las proteínas de shock térmico funcionan como soportes moleculares para prevenir desnaturalización, cambios conformacionales, y plegamiento incorrecto de proteínas y polipéptidos de importancia metabólica y fisiológica [13,17–19]. Las HSP pueden categorizarse por algunas familias como HSP 20-40, HSP60, HSP70, HSP90 y HSP110 [16], siendo HSP70 la familia más conservada entre insectos [20]. La expresión de HSP70 ha sido estudiada como respuesta al estrés térmico al ser imprescindible en la supervivencia de varias familias de artrópodos [21]. La familia de genes *Hsp70* que codifican HSP de 70 kilo Dalton ganaron interés científico al comprobarse su expresión genética inducible frente a diferentes tipos de estrés fisiológico [22–24].

1.1.4 Expresión genética inducible de Hsp70

Los genes que codifican HSP70 pueden clasificarse como constitutivos o inducibles [17,18]. Los genes constitutivos (*Hsc*) codifican proteínas de shock térmico cognadas (HSC) y mantienen activa su transcripción en la mayoría de las células [19–21], pero su expresión no responde al estrés fisiológico [15,21]. Por otro lado, los genes inducibles (*Hsp*) codifican proteínas de shock térmico [1,10,20] y responden al estrés por temperatura [1,4,7,8,15,16], hipoxia [22], pH extremos [23], intoxicación química [24], estrés oxidativo [25] y radiación UV [26]. Se ha demostrado que la inducción transcripcional de *Hsp70* es mediada principalmente por genes cortos de un único exón que carecen del empalme transcripcional [8]. Este es el principal mecanismo de respuesta adaptativa al estrés térmico [1,16] y el responsable de la supervivencia de ectotermos ante modificaciones bruscas en la temperatura [4,16].

1.2 Planteamiento del problema

Los hallazgos climáticos de la era Paleozoica han demostrado que un cambio de 5.2 °C en la temperatura global es suficiente para desencadenar extinciones masivas [2]. A pesar de ello, desde 1960 la temperatura media global ha aumentado 1 °C [27], por lo que las predicciones son catastróficas y anuncian la pérdida masiva de la biodiversidad mundial en un futuro cercano [2]. Existen hallazgos que describen los efectos en especies de insectos por el cambio climático actual [28]. Entre los insectos más afectados se encuentran las mariposas, que para escapar del calor se movilizan

hacia las alturas [29], se dispersan entre microhábitats y modifican su fotoperíodo [30]. El cambio climático también ha modificado varios de sus aspectos genéticos [28,30]. Su tamaño corporal medio, melanismo y variedad genética se redujeron entre lepidópteros los últimos años [30,31]. Estos hallazgos podrían representar el inicio de cambios irreversibles en la biodiversidad de ectotermos.

Entre las zonas más biodiversas del mundo se encuentra la región neotropical. Se estima que alberga alrededor de 1.6 millones de insectos ectotermos [32], representando la mitad de los animales descritos hasta la fecha [18]. No obstante, los estudios sobre tolerancia térmica en organismos de esta región son escasos [18]. Las investigaciones sobre transcripción de genes *Hsp70* se han enfocado principalmente en *D. melanogaster* y algunas mariposas de climas templados [15,22,33–35]. Por ello, la expresión de los genes *Hsp70* frente al estrés térmico es desconocida en la mayoría de los ectotermos de la región neotropical, impidiendo comprender los efectos del cambio climático en insectos de esta zona. Además, la mayoría de los estudios de la respuesta de *Hsp70* frente al estrés térmico se enfocan en una única tagma o sexo [1,4,15,16,19,33,34], ignorando la variedad de respuestas térmicas que podrían ocurrir en una escala poblacional. En ese sentido, es necesario un estudio más amplio sobre la respuesta de genes *Hsp70* frente al estrés térmico en ectomorfos del Neotrópico.

1.3 Justificación de la investigación

El mundo atraviesa cambios climáticos que provocan el deterioro de la biodiversidad y la dispersión de especies [36,37]. Comprender la influencia de la alteración térmica en ectotermos del Neotrópico es fundamental para predecir impactos en la biodiversidad de la zona [38]. *Heliconius erato* (Linnaeus, 1764) es una mariposa que abunda en el neotrópico y se distribuye a través de un gradiente altitudinal extenso [39]. Su genoma fue secuenciado y ha sido estudiada por más de dos siglos, por lo que se la considera un ectotermo modelo [39–41]. A pesar de ello, los estudios de genes *Hsp70* inducibles y constitutivos no se han realizado hasta la fecha en esta especie. El presente estudio plantea identificar los genes desconocidos de *Hsp70* de un único exón y cuantificar su respuesta ante temperaturas extremas como un primer acercamiento a los mecanismos de respuesta genética de *Heliconius erato* ante el cambio climático.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general

Identificar el efecto del estrés térmico sobre la expresión de genes candidatos de *Hsp70* en *Heliconius erato* de un único exón.

1.4.2 Objetivos específicos

- ❖ Cuantificar la expresión de los genes de un único exón de la familia *Hsp70* en mariposas *H. erato* estresadas térmicamente.
- ❖ Evaluar la variación de expresión génica relativa de genes *Hsp70* de un único exón en mariposas *H. erato* de ambos sexos.
- ❖ Comparar la variación de expresión de *Hsp70* en las tres tagmas de *H. erato*.

CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Identificación de genes *Hsp70* y genes endógenos en *Heliconius erato*

Se usó el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para la identificar genes de un único exón de *Hsp70* en el genoma de *Heliconius erato lativitta* anotado en Ensembl con la extensión de Lepbase: the Lepidopteran genome database [42]. El análisis BLAST también fue realizado a cuatro genes candidatos para controles endógenos utilizados en estudios de expresión génica en insectos: *RPS3a* [43], *eEF1A* [44], *GAPDH* [45] y *Actina* [46]. Todas las secuencias utilizadas como referencia para genes *Hsp70* y genes endógenos fueron de *Drosophila melanogaster*. Para identificar los genes candidatos de *Hsp70* se utilizó la secuencia del gen inducible con un único exón *Hsp70Aa*. Sus secuencias CDS (Coding Sequences) se obtuvieron de FlyBase [47] y los análisis BLAST se realizaron en la herramienta de incorporada a Lepbase [42].

2.2 Diseño de cebadores

Se utilizó el software Geneious Prime [48] para diseñar cebadores de las secuencias de los tres genes *Hsp70* de un único exón (SEG por sus siglas en inglés) y de los cuatro genes endógenos con base en los resultados del análisis BLAST. Además, la especificidad de cebadores fue analizada por Primer-BLAST para identificar potenciales amplificaciones de ADN genómico [49]. Como parámetros principales para la selección de cebadores se estableció un rango de longitud de 18 a 30 pares de bases, una temperatura de melting (T_m) entre 55 y 60 °C, una diferencia de T_m entre la cadena Forward y Reverse inferior a 2 °C, de uno a tres nucleótidos C o G en las cinco bases de la cola 3', un contenido de C+G entre 40 y 60 °C y un producto amplificado entre 90 a 150 pares de bases [50–52].

Tabla 1. Descripción de los cebadores diseñados tras la identificación por BLAST.

Cebador	Dirección	Secuencia 5' – 3'	Tamaño (pb)	% GC	T _m (°C)	Amplicón (pb)
F1 HSP70A	Forward	ATGAAACATTGGCCATTTAAGGTAAT	26	30.8	58.1	109
R1 HSP70A	Reverse	CCATGCTGCTGATCTCTTCA	20	50	57.7	109
F2 HSP70A	Forward	TGAAACATTGGCCATTTAAGGTAA	24	33.3	57.3	116
R2 HSP70A	Reverse	TGTCAAAACCATGCTGCTGA	20	45	58.3	116
F1 HSP70B1	Forward	GCGACAAAAGATGCTGGGAC	20	55	59.8	144
R1 HSP70B1	Reverse	AGTACCGCCGCCTAAATCAA	20	50	59.5	144
F2 HSP70B1	Forward	GCGACAAAAGATGCTGGGAC	20	55	59.8	150
R2 HSP70B1	Reverse	ATCAAAAGTACCGCCGCCTA	20	50	59.5	150
F3 HSP70B1	Forward	GCTGCGGAAATTGTGTGAAGA	21	47.6	59.7	150
R3 HSP70B1	Reverse	TGACGTGCCCTTGAACCC	18	61.1	59.9	150
F1 HSP70B2	Forward	AGCTGCGGAAATTGTGTGAAG	21	47.6	59.7	150
R1 HSP70B2	Reverse	GACGTGCCCTTGAACCCA	18	61.1	59.9	150
F2 HSP70B2	Forward	GTAATAAGCTGCGGAAATTGTGT	23	43.5	59.6	150
R2 HSP70B2	Reverse	CCCTTGAACCCACACCATGA	20	55	59.9	150
F1 GAPDH	Forward	GGGATCTGTTGAAGCTGCTG	20	55	58.9	141
R1 GAPDH	Reverse	GCACCAGTTGAGGCAGTAGA	20	55	59.7	141
F2 GAPDH	Forward	CCCGTAGCCAATGTGTCACT	20	55	60	102
R2 GAPDH	Reverse	TGGTCCATTTGCAGCTTCCT	20	50	59.9	102
F1 Actina	Forward	CCATCTATGAGGGCTACGCG	20	60	60.1	121
R1 Actina	Reverse	GCGGTGGTGGTGAAAGAGTA	20	55	60	121
F1 EEF1α	Forward	TCATTGGACACGTCGACTCC	20	55	59.8	149
R1 EEF1α	Reverse	GTCCAACACACCAGGCGTAT	20	55	60.3	149
F1 RPS3A	Forward	GGATATCGAGAAGGCCTGCC	20	60	60	154
R1 RPS3A	Reverse	CTTGTCTCCACCTCACCAC	20	60	60	154

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

2.3 Preparación y recolección de mariposas *Heliconius erato*

2.3.1 Recolección en campo de especímenes parentales

Se recolectaron 12 especímenes de *H. erato* de los alrededores de la reserva ecológica Colonso Chalupas en Napo, Ecuador, de las zonas cercanas al mariposario científico de Ikiam y la vía hacia la granja de Shitig, a 625 y 675 m s. n. m. respectivamente. Las mariposas fueron atrapadas con redes de captura y transportadas en sobres de papel. Se identificaron como macho o hembra y se etiquetaron con un código en la zona distal del ala derecha [53]. Las mariposas se almacenaron y criaron en el insectario científico de la Universidad Regional Amazónica Ikiam, donde fueron alimentadas con flores de plantas *Passiflora punctata* y emulsiones de agua y polen [53].

2.3.2 Apareamiento y desove

Para la fase de apareamiento se enjaularon las mariposas en parejas constituidas por un macho y una hembra saludable. Utilizando el código de identificación previamente otorgado se registró el progreso del desove de las hembras diariamente. Durante las semanas de apareamiento los ejemplares parentales fueron alimentados una vez al día por la mañana, mientras que la recolección de los huevos fue realizada en horas de la tarde.

2.3.3 Cuidado de ejemplares

Se utilizó una incubadora térmica digital (Memmert IN260) para incubar los huevos a una temperatura media de 21.5 °C, donde se criaron un total de 15 orugas hembras y 13 orugas machos en envases plásticos hasta convertirse en mariposas adultas. Las orugas fueron alimentadas con hojas de *P. punctata* y monitoreadas diariamente hasta cumplir el proceso de metamorfosis. Una vez convertidas en mariposas, se identificó el sexo y se catalogó con una marca distintiva en la zona discal del ala derecha [53]. Tras ello, se realizaron cuidados durante dos semanas con alimentación de néctar y emulsiones de miel y polen para un desarrollo adecuado hasta la adultez.

2.4 Pruebas de estrés térmico

Se sometió a la progenie constituida por 15 hembras y 13 machos a pruebas de estrés térmico con tres temperaturas basadas en bibliografía [16,18] con el fin de inducir estrés térmico en los miembros de la progenie. Las mariposas de ambos sexos fueron tratadas con una temperatura baja de 4 °C, una temperatura intermedia de 25 °C o una temperatura elevada de 40 °C utilizando un baño maría controlado por 60 minutos para inducir shock térmico [18]. Cada mariposa recibió un único tratamiento térmico escogido al azar. Los individuos fueron colocados en el interior del baño maría utilizando un recipiente plástico hermético con suficiente oxígeno para cumplir la totalidad de la prueba térmica. Al final del tratamiento las mariposas fueron sacrificadas y almacenadas sin alas en RNA Later (Invitrogen®) para la futura extracción de ARN. El tiempo de caída y recuperación del shock térmico fue registrado.

2.4.1 Tratamiento de temperatura con condiciones térmicas elevadas

El tratamiento de calor a altas temperaturas fue de 40°C durante 60 min [16,18], temperatura que causa shock térmico tras varios minutos de exposición. Para mantener la temperatura a 40°C se utilizó un baño maría a 44°C, causando una constante temperatura de 40°C dentro del aparato contenedor de la mariposa. La temperatura fue monitoreada con un termómetro en pruebas previas para determinar el calor interno del recipiente hermético.

2.4.2 Tratamiento de temperatura con condiciones térmicas bajas

El tratamiento de bajas temperaturas fue de 4°C durante 60 min [16,18], simulando temperaturas del pie de páramo andino que causan un shock térmico en algunas mariposas del género *Heliconius*. Para mantener la temperatura a 4°C se utilizó un baño de agua fría a 3 °C.

2.4.3 Tratamiento de temperatura con condiciones térmicas convencionales

Finalmente, se realizó un baño maría simulando temperaturas ambientales comunes en los trópicos y hábitats naturales de *H. erato* de 25°C durante 60 min, siendo este tratamiento el grupo control del experimento. Los parámetros se mantuvieron acorde a las pruebas térmicas preliminares.

2.5 Extracción de ARN total

2.5.1 Extracción de ARN total de *H. erato*

Las 32 mariposas almacenadas en una solución de RNA Later Invitrogen ® fueron utilizadas para la extracción de ARN. El proceso se llevó a cabo con el Kit de extracción SV Total Isolation System (Promega ®). Se extrajo el ARN total de las tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen. Cada extracción realizada representó una muestra en este estudio.

Los tejidos fueron macerados en 175 mL de búfer de lisis y se agregaron 350 µL de búfer de dilución para cada muestra. La mezcla fue incubada en un baño maría a 70°C durante tres minutos. Tras ello se centrifugó a 13 000 x g durante 10 minutos para separar impurezas de los tejidos. El sobrenadante fue separado en un microtubo y se añadieron 200 µL de etanol al 95%. La mezcla fue transferida a una columna de purificación, e inmediatamente fue centrifugada a 13 000 x g durante un minuto. Posteriormente se realizó un primer lavado de columna con 600 µL de solución de lavado. Se añadió a la columna una mezcla de 40 µL de tampón Yellow Core, 5 µL de MnCl₂ (0.09M) y 5 µL (10u/µL) de enzima DNasa I para inducir la digestión de ADN genómico por enzimas endonucleasas. La columna fue incubada durante 15 minutos a 25°C. Tras ello, se agregaron 200 µL de DNase Stop Solution, seguida de una centrifugación a 13 000 x g durante un minuto. A continuación, se realizaron dos lavados, uno con 600 µL de solución de lavado y otro con 250 µL de solución de lavado, ambos con un paso de centrifugación a 13 000 x g durante dos minutos. Finalmente, el ARN fue eluido utilizando 100 µL de agua libre de nucleasas y almacenado en el ultra congelador Lexicon II UXF50086A a -80°C.

2.5.2 Cuantificación de concentraciones de ARN por espectrofotometría

El ARN total extraído fue cuantificado en el espectrofotómetro de micro volumen NanoDrop (Thermo Scientific™), modelo ND-ONEC-W. Para la cuantificación se utilizó 1 µL de ARN de cada muestra y 1 µL de agua libre de nucleasas como la solución blanco del espectrómetro. Este paso fue necesario para realizar una estandarización de concentraciones de ARN en un paso previo a la síntesis de ADN complementario.

2.5.3 Estandarización de concentraciones de ARN

Las muestras de ARN fueron estandarizadas a una concentración de 20 ng/µL. El volumen necesario de agua libre de nucleasas para la modificación de las concentraciones fue determinado con la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

El volumen de cada alícuota de ARN fue de 100 µL. Las muestras fueron etiquetadas y almacenadas en el ultracongelador a -80°C.

2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.6.1 Síntesis de ADN complementario

La construcción de la librería de ADN complementario (ADNc) se realizó utilizando el sistema de transcripción reversa GoScript® (Promega™) en el termociclador Proflex PCR Systems (Applied Biosystems™).

Primero se realizó una mezcla de 5 µL constituida por 2 µL de ARN diluido a 20 ng/µL, 0.5 µL de cebadores aleatorios (10 µM) y 2.5 µL de agua libre de nucleasas. La mezcla se sometió a 70 °C por cinco minutos y a una temperatura de 4 °C por otros cinco minutos. Los tubos fueron centrifugados y preservados a 4°C. Tras ello, en un bloque frío se realizó una mezcla con un volumen final de 15 µL, constituida por 6.5 µL de agua libre de nucleasas, 4.0 µL de tampón GoScript 5X, 2.0 µL de MgCl₂ (2.5 mM), 1.0 µL de nucleótidos de PCR (0.5 mM), 1.0 µL de enzima transcriptasa reversa (10 u/µL) y 0.5 µL de inhibidores de nucleasas (2u/µL). En adición, fueron realizadas dos

reacciones de control negativo, una utilizando agua libre de nucleasas en vez de ARN y otra orientada a detectar contaminación de ADN genómico con agua en lugar de enzima transcriptasa reversa.

Finalizadas las dos mezclas, se agregaron 15 μ L de la mezcla de reactivos a cada tubo de reacción con la mezcla de 5 μ L ARN y cebadores aleatorios, obteniendo un volumen final de 20 μ L por cada reacción de síntesis de ADNc. Los tubos de reacción con 20 μ L fueron colocados en el termociclador y se incubaron con un perfil térmico de 25 °C por cinco minutos, 42 °C por 60 minutos y 70 °C por 15 minutos. Luego de completado el proceso de síntesis, los tubos fueron almacenados a 4 °C.

2.6.2 Estandarización de perfiles térmicos por PCR

Se realizaron pruebas de perfiles térmicos para evaluar las temperaturas óptimas de melting y annealing para cada par de cebadores. El perfil térmico fue de una temperatura inicial de 95 °C durante 5 minutos. Se continuó con 35 ciclos de PCR, iniciando con una temperatura de 95 °C por 30 segundos. Luego fue utilizado un gradiente de temperaturas de 54, 56, 58 y 60 °C por 30 segundos. Tras el gradiente de temperaturas, se fijó una temperatura de 72 °C por 45 segundos. Una vez finalizados los 35 ciclos, una temperatura final de 72 °C fue establecida durante 5 minutos. Los amplicones fueron almacenados a 4 °C. Las pruebas utilizaron una muestra al azar de la librería de ADNc, elegida por medio de un muestreo aleatorio. Una reacción de control negativo fue agregada a cada perfil térmico con la finalidad de verificar la funcionalidad de los cebadores diseñados, de los ADNc sintetizados y de que los reactivos se encuentren sin contaminaciones. La PCR convencional se realizó con el Kit de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™). Las reacciones tuvieron un volumen final de 10 μ L. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 1 y la cantidad de reactivos de cada reacción de PCR se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Cantidad de reactivo utilizada en una reacción individual de PCR.

Componente	Cantidad (uL)	Concentración final
Agua libre de nucleasas	7.06	-
Búfer de PCR [10X]	1	1X
MgCl ₂	0.3	1.5 mM
dNTP Mix [2 mM]	0.2	0.2 mM
Cebador Forward [10 µM]	0.2	1 µM
Cebador Reverse [10 µM]	0.2	1 µM
Platinum® Taq enzyme	0.04	1 u/µL
ADNc [500 ng/µL]	1	100 ng/uL
Total	10	-

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

2.6.3 Visualización de productos PCR por electroforesis en gel

Los amplicones de la PCR convencional fueron revelados y analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE de concentración 1X. Fueron cargados 4 µL de cada producto de PCR con su respectivo control negativo. Como marcador de peso molecular se utilizó el reactivo 100-1000 pb DNA Ladder (Promega™). Para la revelación de resultados se utilizaron 3uL del tampón de carga Blue Juice™ a una concentración final de 2X en cada muestra. Las condiciones de la corrida de electroforesis fueron de 400 mAmp y 100 Voltios por 60 minutos en la cámara de Thermo Scientific™. Para visualizar las bandas de ADN, el gel fue teñido con el agitador orbital Orbit LS (Labnet™) durante 40 minutos en presencia de 5 µL de Diamond Nucleic Acid Dye (Promega™) en 60 ml de TBE 1X reutilizado. Finalmente, el gel fue revelado en el fotodocumentador Enduro GDS touch 1302 (Labnet™).

2.7 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

2.7.1 Extracción de ADN genómico de *H. erato*

El ADN genómico de *H. erato* fue aislado empleando el kit DNeasy® Blood & Tissue de QIAGEN. Se comenzó cortando un tercio del tórax de una mariposa *H. erato* con bisturí y depositando el tejido en el tubo de lisis con 270 µL de tampón ATL. Se agitó 30 veces por segundo durante un minuto. Tras ello, se centrifugó a 3200 rpm por 2 minutos. Al tubo se agregaron 30 µL de proteinasa K y se mezcló por vórtex. El tubo

de reacción fue incubado a 56 °C en un baño maría. Al finalizar el tiempo de incubación, se centrifugó por 10 minutos a 3200 rpm. El sobrenadante fue eliminado extrayéndolo con una micropipeta de 1000 µL. Tras ello, se agregaron 6 µL de RNase A, se mezcló por vórtex y se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 minutos. Se agregaron 300 µL de tampón AL y 300 µL de etanol. La mitad de la mezcla fue pipeteada en una columna de spin que se centrifugó a 3200 rpm por un minuto. La columna de spin se agregó a un nuevo tubo de 2 mL. Se agregaron 500 µL de tampón AW1 y se centrifugó nuevamente a 3200 rpm por 1 min. Tras ello, la columna de spin fue transferida a otro tubo de 2 mL y se agregaron 500 µL de tampón AW2. Esta mezcla fue centrifugada por 3 minutos a 14 000 rpm. Finalmente, La columna de spin fue agregada a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 mL. El ADN fue eluido añadiendo 200 µL de tampón AE al centro de la membrana de la columna y centrifugando por 2 minutos a 3200 rpm. El ADN genómico obtenido fue almacenado a -20 °C.

2.7.2 Curvas de calibración de cebadores

Se realizaron cuatro diluciones seriadas de ADN genómico de *H. erato lativitta* con razones 1:1, 1:3, 1:9 y 1:27, partiendo de una concentración de 1.335 ng/µL registrada por Qubit 3™ con el Kit de alta sensibilidad de doble hebra (high sensitivity 1X dsDNA). Los cebadores fueron probados para cada dilución seriada en reacciones triplicadas de PCR en tiempo real. Los resultados de PCR se utilizaron para producir curvas de ciclos de umbral vs log (concentración). Tras ello, se identificaron y registraron los resultados de las ecuaciones lineales, pendientes y valores de R² de las curvas. Los cálculos y figuras se realizaron con el software GraphPad Prism 8.

2.7.3 Cálculo de eficiencia de qPCR

La eficiencia de amplificación de qPCR (*E*) se calculó utilizando los resultados de las ecuaciones obtenidas por curvas de calibración, a partir de la ecuación de la eficiencia de PCR [50,54], donde *m* representa la pendiente de la curva estándar:

$$E = 10^{(-\frac{1}{m})}$$

2.7.4 Validación de cebadores por curvas de melting

La calidad de los cebadores y de las reacciones de PCR en tiempo real fueron validadas por una curva de melting con un gradiente de temperatura de 65 a 95 °C. La temperatura en °C fue relacionada con los resultados de unidades referenciales de fluorescencia (RFU) para construir las curvas. Las gráficas fueron obtenidas directamente del software CFX Maestro del termociclador Biorad de tiempo real CFX 96 Touch.

2.7.5 PCR en tiempo real de genes *Hsp70* y endógenos

Fueron seleccionados 18 organismos tratados con calor, frío y temperatura ambiente, de forma que cada tratamiento térmico presentó tres hembras y tres machos. Un total de 54 muestras fueron evaluadas por RT-qPCR, incluyendo muestras de cabeza, tórax y abdomen de cada mariposa utilizando el termociclador de tiempo real BioRad CFX 96 Touch. Para cada muestra se utilizaron tres pares de cebadores de genes *Hsp70* y un par de cebadores del gen referencial GAPDH. Dos reacciones de control negativo fueron adicionadas a cada par de cebadores, constituidas por todos los componentes de la reacción, exceptuando el ADNc que fue sustituido por agua libre de nucleasas. El perfil térmico utilizado para las reacciones de RT-qPCR fue el establecido previamente en la PCR convencional tras seleccionar las mejores temperaturas de los perfiles térmicos (Anexos 1 - 6). La cantidad utilizada de reactivo para una reacción individual se detalla en la Tabla 3. Los resultados de las reacciones fueron registrados en el software CFX Maestro e importados en R Studio.

Tabla 3. Cantidad de reactivo utilizada en una reacción individual de RT-qPCR.

Componente	Cantidad (uL)	Concentración final
Agua libre de nucleasas	2	-
PowerUp TM SYBR TM Green [2X]	5	1X
Cebador Forward [10 µM]	1	1 µM
Cebador Reverse [10 µM]	1	1 µM
ADNc template [500 ng/µL]	1	100 ng/µL
Total	10	-

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

2.8 Transformación de datos de RT-qPCR y análisis estadísticos

2.8.1 Cuantificación absoluta por curvas de calibración

Se utilizaron las ecuaciones deducidas de las curvas de calibración en función de x para calcular la cantidad final en gramos del amplicón [50,54,55].

$$x = 10^{\frac{C_T - b}{-m}}$$

A continuación, se utilizaron los valores de concentración para calcular el número total de copias de ADN usando la fórmula [54,56]:

$$\frac{\text{Copias de ADN}}{\text{uL}} = \frac{CA \times x}{TA \times PMP}$$

Donde:

- CA: Constante de Avogadro = $6.022 \times 10^{23} \left(\frac{\text{copias de ADN}}{\text{mol}} \right)$
- x : cantidad de ADN (*gramos*)
- TA: tamaño del amplicón (*pares de base*)
- PMP: Peso molecular promedio de un par de base = $\left(\frac{660 \text{ g/mol}}{\text{pb}} \right)$

2.8.2 ANOVA factorial del gen endógeno

Pruebas de normalidad de Shapiro Wilk, homocedasticidad de Levene, identificación de valores extremos, gráficas Q-Q y ANOVA factoriales fueron realizados en R Studio usando los paquetes Rstatix, Datarium, ggplot2 y ggpubr.

2.8.3 Cuantificación relativa por método de $\Delta\Delta CT$

La normalización de datos de cuantificación relativa se realizó siguiendo el método descrito por Livak en 2001 [50,57,58]. En el primer paso se restaron los C_T de los genes *Hsp70* de los C_T del gen endógeno:

$$\Delta C_T = C_{T(Hsp70)} - C_{T(GAPDH)}$$

Los ΔC_T del tratamiento control fueron promediados. Tras ello, se realizó otra resta del valor ΔC_T de los tratamientos con calor y frío frente al ΔC_T de los tratamientos control promediados, tal que:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(tratamiento)} - \Delta C_{T(control)}$$

La proporción de la expresión normalizada fue calculada usando la expresión:

$$RGE = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Finalmente, las gráficas de expresión génica relativa normalizadas fueron realizadas en el software R Studio utilizando la librería ggplot2.

2.8.4 Modelos lineales generalizados

Los datos de expresión génica relativa fueron sometidos a modelos lineales generalizados usando R Studio para cada gen *Hsp70*. Se identificó el tipo de distribución de los datos de expresión génica relativa y se ajustó el modelo con una función de enlace de tipo log para distribuciones de Poisson e inversa para distribuciones Gamma. Se realizaron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para las distribuciones residuales y gráficas Q-Q. Finalmente, los resultados del modelo fueron analizados a través de ANOVA tipo II.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

3.1 Identificación de genes Hsp70 y endógenos en *Heliconius erato*

En el genoma de *H. erato* se encontraron coincidencias con valores esperados (E) < 0.05 de todos los genes de *D. melanogaster* utilizados para el alineamiento de secuencias nucleotídicas (Tabla 4). Para los genes endógenos *RPS3A*, *Actina*, *eEF1 α* y *GAPDH* se eligió la coincidencia con menor valor E y mejor score. Para los genes *Hsp70* se tomaron en cuenta las cinco secuencias encontradas. La coincidencia 1/5 (HEL_010335-RA) corresponde a una proteína de shock térmico cognada (HSC) de 71 KDa con 9 intrones [59], mientras que 5/5 (HEL_010335-RA) corresponde a una *Hsp70* con 6 intrones [60]. Las coincidencias 2/5*, 3/5* y 4/5* son *Hsp70 SEG*. Durante las siguientes secciones de este trabajo las secuencias 2/5, 3/5 y 4/5 de *Hsp70* se nombran *Hsp70A* (HEL_005377-RA), *Hsp70B1* (HEL_013537-RA) y *Hsp70B2* (HEL_013538-RA).

Tabla 4. Resultados obtenidos de análisis BLAST en la base de datos lepbased. Hits marcados con negrita hacen referencia a genes de un único exón.

Gen	Hit	Score	E value	Query Cover	Length (pb)	Flybase ID	Lepbase ID
Actina	1/5	1407.9	0	(87.53%) 990/1131	1131	FBgn0286832	HEL_011520-RA
eEF1α	1/3	1195.1	0	(78.97%) 1085/1374	1362	FBgn0284245	HEL_001340-RA
Hsp70	1/5	996.1	0	(71.96%) 1329/1852	3009	FBgn0013275	HEL_010335-RA
Hsp70	2/5	711.8	0	(70.32%) 1111/1580	1641	FBgn0013275	HEL_005377-RA
Hsp70	3/5	520.7	6.43E-147	(69.67%) 836/1200	1284	FBgn0013275	HEL_013537-RA
Hsp70	4/5	520.7	6.43E-147	(69.67%) 836/1200	1512	FBgn0013275	HEL_013538-RA
RPS3A	1/1	199.7	2.28E-50	(73.13%) 245/335	795	FBgn0017545	HEL_010107-RA
GAPDH	1/1	131.1	7.22E-30	(70.89%) 207/292	687	FBgn0001091	HEL_005745-RA
Hsp70	5/5	109.5	3.80E-23	(68.89%) 186/270	1215	FBgn0013275	HEL_012373-RA

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

Hsp70A se encuentra en la hebra con extremo 5' a 3' del cromosoma 18, mientras que los genes *Hsp70B1* y *Hsp70B2* se encuentran en la hebra de los extremos 5' a 3' del cromosoma 2, son separados por una región no codificante de apenas 70 pb y presentaron un valor $E = 6.43E-147$ en ambos casos. Por otro lado, se excluyeron de

este estudio los análisis de las coincidencias 1/5 y 5/5 ya que corresponden a genes con varios intrones de la familia *Hsc* y *Hsp* (HEL_010335-RA y HEL_012373-RA) y su análisis no forma parte de los objetivos de este estudio.

3.2 Cebadores

Se sintetizaron un total de siete pares de cebadores para los genes *Hsp70* SEG y cinco pares de cebadores para los genes endógenos con tamaños entre 18 a 26 pb, amplicones entre 102 a 154 pb, CG entre 30 y 62 % y Tm teórico < 62.2 °C (Tabla 1).

Los cebadores *Hsp70A* F2/R2, *Hsp70B1* F2/R2, *Hsp70B2* F2/R2, *GAPDH* F2/R2 y *Actina* F1/R1 mostraron amplificación en las pruebas de perfiles térmicos (Anexos 1 – 5). Con base en los resultados de PCR convencional se calculó que la temperatura promedio óptima de annealing de los cebadores fue 58.5° C. Los cebadores de *RPS3A* y *EEF1A* mostraron errores de amplificación en las temperaturas cercanas a 58 °C, por lo que se descartaron del análisis por RT-qPCR (Anexo 6). La especificidad de todos los cebadores fue determinada por pruebas *in silico* con Primer-BLAST para el genoma de *Heliconius erato* [49]. *GAPDH* y *EEF1A* presentaron un único resultado con tamaño de amplicón esperado, mientras que no se identificaron coincidencias con *Actina*, *RPS3A*, *Hsp70A*, *Hsp70B1* y *Hsp70B2* (Anexos 7 y 8).

Las de calibración fueron obtenidas de reacciones de PCR cuantitativa con SYBR Green Máster Mix. Las reacciones se acompañaron de una curva de melting para identificar posibles fallos en el diseño de cebadores. Se obtuvieron curvas de melting de un único pico para los cebadores de *GAPDH*, *Hsp70A*, *Hsp70B1* y *Hsp70B2* (Anexo 9). Las reacciones de *Actina* mostraron errores en su amplificación, causando curvas de calibración con eficiencia de amplificación inferior al 90%, por lo que se excluyó a este gen del análisis (Figura 1). Los valores R cuadrado de las curvas de calibración fueron superiores a 0.99 para *GAPDH* y los genes de *Hsp70*. Las eficiencias calculadas fueron superiores a 93% y no difirieron entre sí por menos de 4.2%.

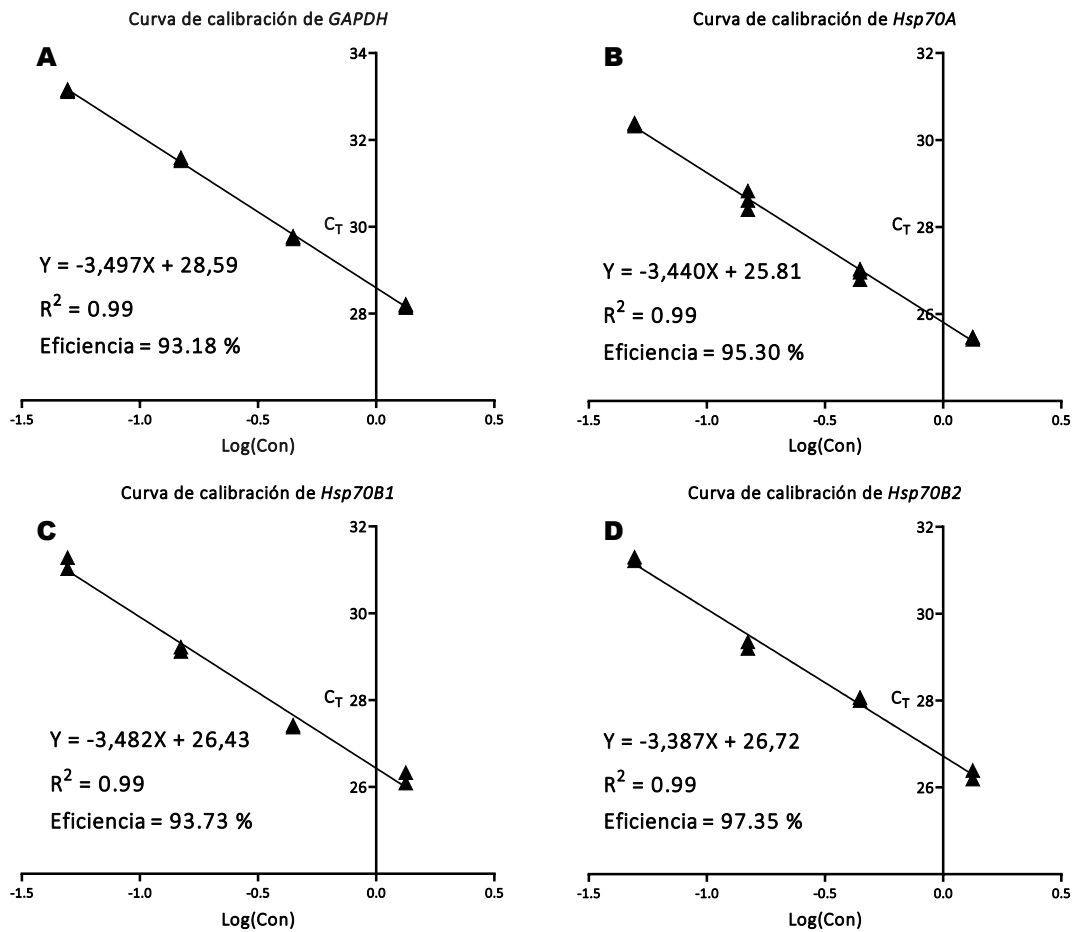


Figura 1. Curvas de calibración de cebadores con 4 series de dilución. A) Curva de calibración de GAPDH. B) Curva de calibración de Hsp70A. C) Curva de calibración de Hsp70B1. D) Curva de calibración de Hsp70B2.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

3.3 Cuantificación de ARN

Las 93 muestras extraídas de ARN fueron cuantificadas. El promedio de concentración fue de 324.24 ng/L con SD = 212.05. A 260/280 presentó un promedio de 2.11 con SD = 0.14 y A260/230 tuvo un promedio de 1.86 con SD = 0.27 (Anexo 10).

3.4 Validación del gen endógeno GAPDH por ANOVA factorial

Para los supuestos de ANOVA se evaluó la normalidad de sus valores residuales por una prueba de Shapiro-Wilk con $P = 0.192$ y una QQ-Plot (Anexo 11). Su homocedasticidad también fue validada por la prueba de Levene con $P = 0.774$.

Además, no se encontraron valores extremos. La gráfica de cajas y bigotes del gen GAPDH (Anexo 12) demostró una dispersión de los datos de CT basado en el CT medio por tagma, sexo y tratamiento.

A través de un ANOVA de tres factores se pudo identificar que la variable tagma presentó un valor F de 587.92 con un valor $P < 0.05$. El factor tagma fue el causante de la mayor variabilidad en los CT de GAPDH, mostrando un valor ges de 0.970. El factor sexo tuvo un valor F de 27.21 con un valor $P < 0.05$ y ges de 0.430. El factor tratamiento tuvo un valor $F = 9.232$, $P < 0.05$ y ges = 0.339. Finalmente, la combinación de factores sexo y tagma tuvo un valor $F = 4.076$ con $P < 0.05$ y ges = 0.185. Las demás combinaciones factoriales produjeron valores $P > 0.05$, por lo que se ignoraron como factores causantes de la variabilidad de los CT (Anexo 13).

Se demostró que al eliminarse el factor tagma del modelo (Anexo 14), la variabilidad en las medias de los tratamientos se redujo, corroborando los resultados obtenidos por el ANOVA factorial de tres vías. El ANOVA de dos vías realizado con los factores sexo y tratamiento no mostró variables con valores $P < 0.05$ (Anexo 15). Los hallazgos sugieren que la exclusión del factor tagma redujeron la variabilidad significativa en el gen endógeno utilizado, por lo que se concluyó que la mayor fuente de variabilidad se debe al factor tagma en este experimento.

3.5 Cuantificación absoluta

En la figura de cuantificación absoluta de copias de ADN de GAPDH (Anexo 16), se puede observar que la mayor variabilidad se presenta en las diferentes tagmas, confirmando los resultados obtenidos en el ANOVA de tres vías. El patrón de comportamiento del gen GAPDH se incumple únicamente en la tagma tórax para organismos femeninos, donde se observó un decrecimiento en los tratamientos control y frío comparado con la tagma tórax para machos (Anexo 16).

En cuanto a la cuantificación absoluta de los genes *Hsp70*, *Hsp70A* presentó una cantidad de copias de ADN totales superior en el tratamiento térmico con calor, comparado con los tratamientos frío y control (Anexo 17). Por otro lado, *Hsp70B1* y *Hsp70B2* mostraron un comportamiento similar entre ellos con un aumento de copias

de ADN destacable únicamente en el tórax de los organismos machos tratados con calor (Anexos 18 y 19).

3.6 Cuantificación relativa de genes HSP70

La expresión génica relativa (RGE) de los genes de los tres SEG de *Hsp70* evaluados fueron mayores en el tratamiento de calor, comparados con el tratamiento control. El genes *Hsp70A* tratado con calor alcanzó valores promedio de RGE de hasta 300 veces más que el tratado con temperatura control (Figura 2). Los genes *Hsp70B1* y *Hsp70B2* tratados con calor mostraron una RGE de hasta 12.5 veces más que en el control (Figuras 3 y 4). La expresión de los genes *Hsp70* en frío tuvo amplia variabilidad en la RGE, por lo que se evaluó a través de GLMs. En los modelos lineales generalizados se identificó que el factor tratamiento tuvo la mayor influencia en la RGE de todos los genes *Hsp70* (LR = 4555.73, $P < 0.0001$).

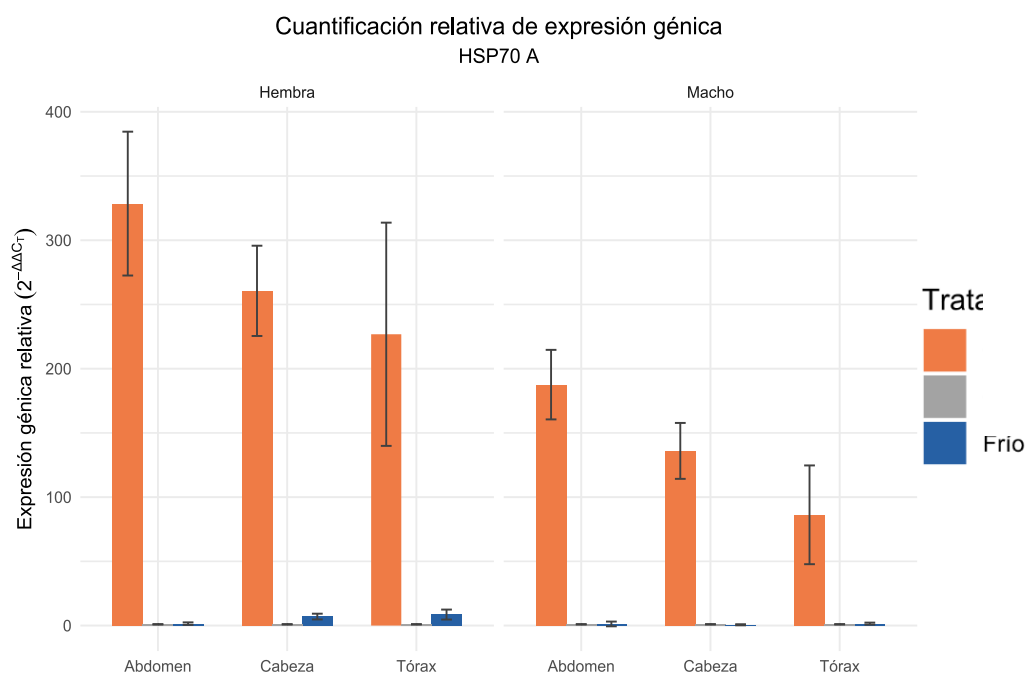


Figura 2. Expresión génica relativa de *Hsp70A* en tratamiento de calor (40°C) y frío (5°C).

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

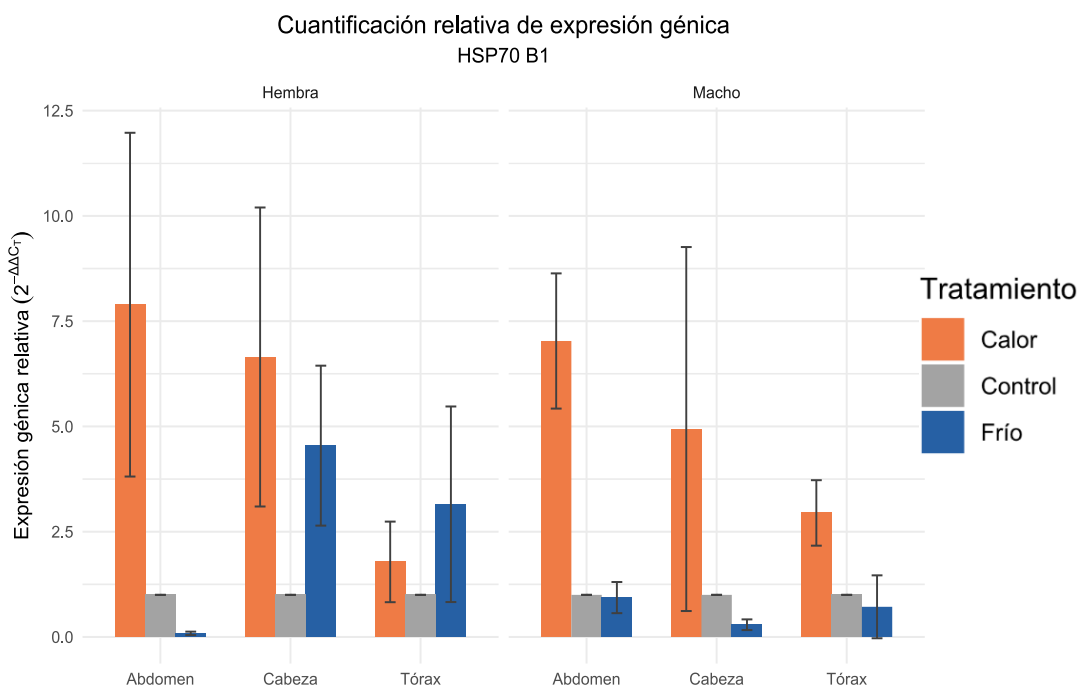


Figura 3. Expresión génica relativa de *Hsp70B1* en tratamiento de calor (40°C) y frío (5°C).
Realizado por: Camino, Leo, 2022.

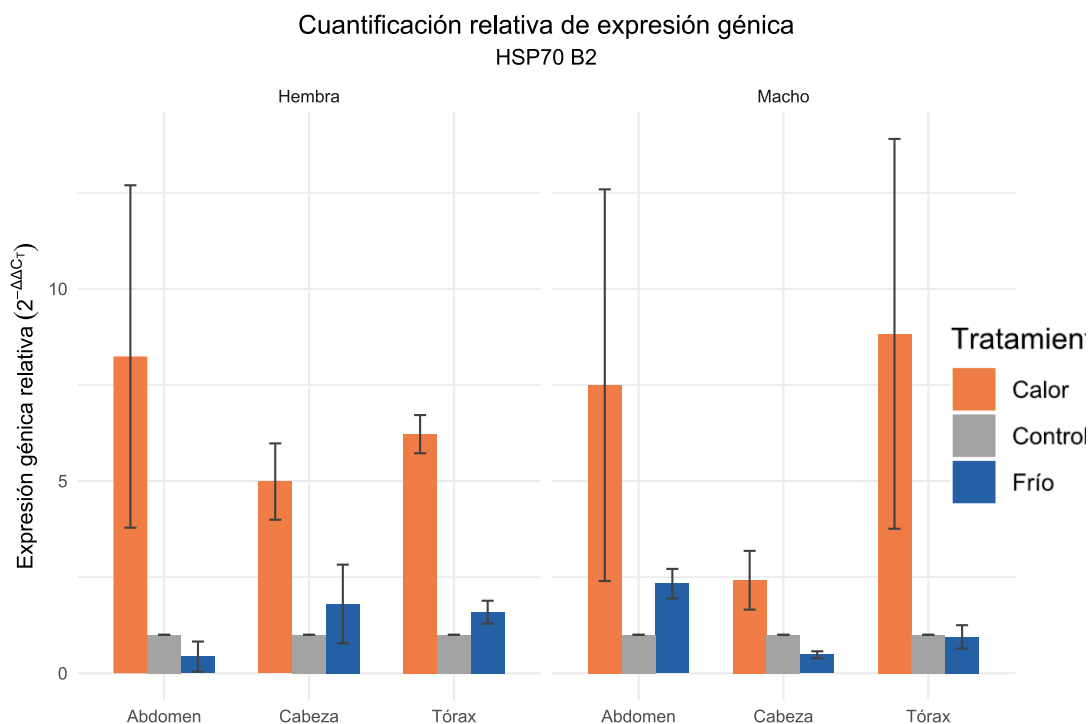


Figura 4. Expresión génica relativa de *Hsp70B2* en tratamiento de calor (40°C) y frío (5°C).
Realizado por: Camino, Leo, 2022.

Tabla 5. Estimaciones paramétricas de modelos lineales generalizados en la variación de expresión génica de *H. erato*. $P < 0.01$: ‘*’, $P < 0.001$: ‘**’, $P < 0.0001$: ‘***’.

Hsp70A	LR	Df	P	P < 0.05
Tratamiento	4555.73	1	0	***
Sexo	432.71	1	4.17E-96	***
Tagma	139.21	2	5.90E-31	***
Tratamiento:Tagma	24.8	2	4.12E-06	***
Sexo:Tagma	21.84	2	1.81E-05	***
Tratamiento:Sexo	6.79	1	0.0092	**
Hsp70B1	LR	Df	P	P < 0.05
Tratamiento	16.38	1	5.19E-05	***
Tratamiento:Tagma	10.88	2	0.0043	**
Tratamiento:Sexo	9.04	1	0.0026	**
Hsp70B2	LR	Df	P	P < 0.05
Tratamiento	93.4	1	4.28E-22	***
Tratamiento:Sexo:Tagma	26.97	2	1.39E-06	***
Tagma	9.51	2	0.0086	**
Sexo:Tagma	8.58	2	0.0137	*

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

La función *Anova* de paquete ‘car’ en R fue utilizada para estimar los valores de razón de verosimilitud por Chi cuadrado (LR por maximum likelihood ratio), Grados de libertad (Df) y valores P.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Diseño experimental

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR) es una técnica veloz, ampliamente utilizada y aceptada para la medición de resultados certeros y sensibles de expresión génica [50,61,62]. La PCR cuantitativa requiere de un correcto diseño experimental debido a que los ajustes y configuraciones preliminares para el análisis de expresión génica son necesarios para producir resultados confiables [61]. Los estudios de expresión génica relativa están fundamentados en tres aspectos importantes: el análisis de uno o varios factores experimentales, el ajuste adecuado de los genes referenciales y la utilización de un tamaño muestral suficientemente extenso para la realización de análisis estadísticos [50,61,62].

4.1.1 Factores experimentales

La cantidad de estudios de expresión génica en insectos ha ido en aumento en la última década [62]. Los estudios más actualizados de expresión génica de insectos tienen una tendencia a acoplar más de un factor de estudio a sus diseños experimentales [62]. En la revisión bibliográfica de estudios de RT-qPCR en insectos en el período 2008 a 2017, Lü *et al.* (2018) recopilaron información sobre los 10 factores experimentales más populares [62]. Tras analizar un total de 90 investigaciones con 39 factores experimentales, determinaron que los factores tagma, temperatura y sexo tuvieron el segundo, tercer y octavo lugar en la lista [62]. En este estudio se realizó una comparación de RGE entre tagmas, temperatura y sexo, por lo que el diseño experimental se ajustó al enfoque observado durante los últimos años en estudios de RGE con insectos [62–64].

4.1.2 Genes de referencia

Los genes de referencia para PCR cuantitativa no son universalmente estables. Esto significa que diferentes organismos modelo o factores estudiados pueden alterar la estabilidad de su expresión génica. Un ejemplo de ello fueron los resultados obtenidos

por Lu *et al.* en 2013, que mostraron que en tratamientos con alteración de temperatura *GAPDH* y *EEF1A* eran genes de referencia óptimos para *Spodoptera litura* [64], mientras que *RPS15*, *B-tubulin* y *EEF1A* fueron los más estables en *Nilaparvata lugens* según Yuan *et al.* en 2014 [63]. En este estudio, *GAPDH* y Actina fueron genes candidatos utilizados para la cuantificación de expresión génica de *Hsp70* debido a su amplio uso en experimentos de RT-qPCR [50–52]. Por otra parte, *EEF1A* y *RPS3A* fueron dos candidatos más de genes endógenos. Su empleo fue considerado por ser frecuentemente utilizados en experimentos de RT-qPCR en insectos, incluyendo a mariposas del género *Heliconius* [62–67] .

Entre los pasos más importantes dentro de un estudio de RT-qPCR se encuentra el diseño experimental [61]. Los experimentos de RT-qPCR requieren la utilización de un número de réplicas biológicas estadísticamente estable para mostrar resultados significativos. Mientras más amplio es el número de réplicas biológicas, menor es la variabilidad detectada en los tratamientos [61,68]. Los análisis por duplicado biológico son la cantidad mínima sugerida para análisis por PCR cuantitativa [50]. Este estudio tuvo un total de 18 combinaciones factoriales entre tagma, sexo y tratamiento, cada una con tres réplicas biológicas para cada combinación (54 muestras totales), lo que permitió la examinación estadística de los datos obtenidos por ANOVA y GLMs.

4.2 Cebadores

4.2.1 Análisis BLAST

La elección de cebadores es probablemente el factor más importante en la PCR [51,52,69]. El funcionamiento incorrecto de cebadores puede causar que los resultados esperados en un experimento se alteren o generen errores, principalmente cuando son diseñados y probados por primera vez [69]. Una de las herramientas más utilizadas en el diseño de cebadores es el algoritmo BLAST para examinar las posibles cadenas diana de un genoma [52,69]. En este estudio se utilizó el análisis BLAST para identificar secuencias de genes de *H. erato* deducidas a partir de las anotaciones del genoma de *D. melanogaster*. Los valores E y S son dos parámetros de BLAST que permiten validar estadísticamente las coincidencias obtenidas [70]. El valor esperado (E) hace referencia a la probabilidad de que la coincidencia sea encontrada por el azar, decreciendo exponencialmente cuando el valor de score (S) aumenta [70]. Esto

significa que mientras más bajo es el valor E, la coincidencia es estadísticamente más significativa [70]. Todos los resultados de BLAST presentaron valores $E < 3.80E-23$, sugiriendo que son estadísticamente significativos en los cinco genes utilizados para esta sección (*GAPDH*, *Actina*, *EEF1A*, *RPS3A* y *Hsp70*).

4.2.2 Especificidad de cebadores

La especificidad de los cebadores debe ser validada *in silico* con pruebas como BLAST y evidenciada experimentalmente a través de PCR con la presencia de una única banda en geles, perfil de melting en RT-qPCR y la determinación del tamaño de amplicones esperados de forma experimental [50,52]. La especificidad de los cebadores fue predicha por pruebas *in silico* a través del Primer-BLAST [49] y se validaron los resultados por PCR y RT-qPCR. Por otra parte, se sugiere frecuentemente que la secuencia de los amplicones presente una dimensión de 75 – 150 pb y carezca de estructuras secundarias [51], ya que las secuencias capaces de formar estructuras secundarias *in vitro* son comúnmente sitios de inestabilidad genómica *in vivo* [71]. Los resultados en geles mostraron una única banda de amplificación de los tamaños esperados dentro del rango de 75 a 150 pb para los cebadores estudiados (Anexos 1 - 6), mientras que la simulación con Primer-BLAST no identificó inespecificidad para el genoma de *Heliconius erato lativitta* registrado en NCBI [72].

4.3 Material genético

4.3.1 Integridad del material genético

Los resultados de la PCR son alterables al utilizar material genético degradado o contaminado con compuestos inhibitorios de PCR [61,73]. La adecuada extracción de ARNm y calidad del templado utilizado es fundamental para conseguir resultados confiables de expresión genética relativa [61,73]. El manejo de ARN es complejo debido a su naturaleza inestable y fácil degradabilidad, por lo que la distorsión de los resultados es común cuando se realiza una inadecuada extracción y preservación del material genético [61,73]. Adicionalmente, se ha indicado que es inapropiado comparar muestras degradadas con muestras intactas debido a la amplia variabilidad causada en los resultados obtenidos [73]. Uno de los mecanismos utilizados para prevenir la

degradación del ARN fue la preservación a -80 °C en ultracongelador, como se recomienda en la bibliografía [74–76]. Por otro lado, en este estudio se identificaron valores promedio de 1.86 para A 260/280 y 2.11 en A 260/230 en las muestras de ARN, indicando una extracción de calidad con ausencia de compuestos fenólicos o inhibitorios de PCR [73,77–79]. Finalmente, en la síntesis de ADNc fue utilizado RNAsin como inhibidor de nucleasas para la inactivación de enzimas RNAsas [80].

4.3.2 Transcripción reversa

El material genético utilizado para la RT-qPCR es ADNc sintetizado a partir de ARNm [50–52,81]. La síntesis es conducida a partir de la enzima transcriptasa reversa, la cual se encarga de sintetizar una cadena complementaria de ADN [50–52,81]. Algunos de los errores observados en PCR cuantitativa se enlazan a la síntesis de ADNc debido a los posibles fallos en la síntesis o errores de estandarización del material genético de partida [82–84]. La bibliografía sugiere la utilización de un mix de transcripción reversa con cebadores de secuencias aleatorias (Random Primers) para permitir un mejor muestreo de los ARNm [51,82]. Las reacciones de transcripción reversa para genes *Hsp70* y endógenos fueron realizadas utilizando una mezcla de cebadores aleatorios y oligo dT del kit GoScript (Promega), cumpliendo esta sugerencia. Además, la bibliografía recomienda utilizar la misma cantidad de ARN total y el mismo tiempo de reacción en la transcripción reversa del ADNc para eliminar las fuentes de variabilidad provenientes de las diferentes réplicas biológicas [51,82]. En este estudio se estandarizó una concentración de 20 ng/μL de concentración inicial de ARNm para la síntesis de ADNc para todas las muestras.

4.4 Cuantificación absoluta de copias de ADN

La cuantificación absoluta se caracteriza por la utilización de los CT obtenidos por la RT-qPCR para calcular la cantidad de ADN total [50–52]. Consiste en utilizar curvas de calibración de CT de muestras con concentraciones de ADN conocidas y determinar la concentración de las muestras desconocidas [50]. En este método es frecuente utilizar un paso en el diseño experimental que normalice la cantidad de ácido nucleico obtenido de las curvas de calibración a una unidad de muestra de origen, como un número de células fijo, volumen específico o un total de ácido nucleico de partida [50]. Este paso es necesario debido a que reduce la variabilidad causada en este método

por efecto de errores en las concentraciones de partida de las muestras [51]. El paso de normalización de las muestras de este estudio consistió en la preparación de alícuotas de ARN total con una concentración de origen de 20 ng/μL para todas las muestras. Por este paso preliminar es posible asumir que la variabilidad observada en los distintos genes tiene origen en diversos factores no relacionados con la cantidad de material genético de partida utilizado para cada reacción.

4.4.1 Validación genes endógenos

El modelo experimental típico utilizado para análisis de expresión génica por PCR cuantitativa suele estar compuesto por el CT como variable de respuesta y un único factor de análisis con varios niveles [62]. En el presente estudio, la expresión génica relativa de los genes *Hsp70* SEG de *H. erato* fueron analizadas con un modelo experimental basado en tres factores: tratamiento térmico, sexo y tagma. Los reportes del Anexo 12 evidenciaron heterogeneidad en los CT de GAPDH. La heterogeneidad fue comprobada por una prueba de ANOVA factorial, sugiriendo que el factor tagma fue el más influyente ($P = 3.25E-28$, $F = 587.921$). La variabilidad vista en las muestras de distintas tagmas puede deberse a diversas causas. Las tagmas presentan diferentes composiciones celulares, lo que puede alterar la expresión de genes como GAPDH [85–87]. Por otra parte, el análisis de CT por ANOVA no suele ser una herramienta común para identificar variabilidad en los resultados ya que los estudios de PCR cuantitativa suelen contemplar un único factor de análisis. Sin embargo, existen algunos estudios que han incorporado ANOVA a sus análisis de CT como el de Branquinho *et. al* en 2012 [88].

4.5 Cuantificación relativa de expresión génica

4.5.1 Eficiencia de amplificación

La eficiencia de amplificación (E) se define como la fracción de moléculas diana que son copiadas en un ciclo de PCR [89]. Depende de varios factores como la presencia de inhibidores de PCR o la variabilidad de las concentraciones de reactivos implementados [89,90]. Un ensayo de PCR correctamente diseñado debería presentar una amplificación de ADN de al menos 90% de eficiencia evaluada a través de calibración con diluciones seriadas [81,89,90]. En RT-qPCR con cuantificación relativa

se recomienda que la diferencia entre la eficiencia de amplificación de los cebadores sea menor al 5% entre los genes de interés y los genes endógenos [50]. En este estudio se prepararon curvas de calibración con un factor de dilución de 1:1, 1:3, 1:9 y 1:27 con una concentración inicial de ADN genómico de 1.335 ng/ μ L. Se obtuvieron eficiencias de amplificación: 93.18 % (GAPDH), 95.30 % (*Hsp70A*), 93.73 % (*Hsp70B1*) y 97.35 % (*Hsp70B2*), por lo que se los genes utilizados cumplieron los requisitos descritos por la bibliografía. Por otra parte, se identificaron problemas de amplificación que causaron valores $E < 90$ % en los cebadores de Actina, por lo que se descartó como gen endógeno.

4.5.2 Expresión de genes Hsp70 en otros estudios

Los genes de las familias *Hsp* son ampliamente conservados en el genoma de seres vivos y cumplen la función de mitigar el estrés celular, principalmente causado en temperaturas elevadas [10,11,14]. En el presente trabajo se identificaron los niveles de expresión génica de *Hsp70* SEG en mariposas, evidenciando una sobreexpresión a temperaturas elevadas. Algunos estudios han encontrado resultados similares a los obtenidos, relacionados a la expresión génica en temperaturas cercanas a 40 °C. Cedraz *et al.* (2017) realizaron un estudio con *Gallus gallus* sometidos a un estrés térmico de 39 ± 1 °C, donde identificaron sobreexpresión de los genes *Hsp70* al comparar la expresión con individuos tratados con temperatura control de 23 °C [91]. Por otra parte, en un estudio con mariposas *Melitaea cinxia* se identificó sobreexpresión de genes *Hsp70* con un incremento gradual entre temperaturas de 30 y 40 °C, mientras que los tratamientos con 0° C reportaron una leve sobreexpresión, demostrando plasticidad en tratamientos con temperaturas altas y bajas [16]. Similar a lo anteriormente mencionado, se pudo identificar que algunas mariposas *H. erato* presentaron sobreexpresión de *Hsp70* en temperaturas de 4° C, principalmente en los genes *Hsp70 B1* y *B2*. Sin embargo, la mayor variabilidad de RGE se registró en temperaturas de 40 °C, donde se los niveles de sobreexpresión alcanzaron hasta 300 veces más que el control (25 °C).

4.5.3 Variabilidad de la expresión en réplicas biológicas

La transcripción de ARNm es un proceso sensible a estímulos externos, por lo que las condiciones en las que las muestras son tratadas requieren control y condiciones

estandarizadas [51]. Se ha demostrado que la aclimatación a temperaturas de 35 °C los tres días antes de ensayos térmicos causa una disminución en la expresión de genes *Hsp70* en mariposas [16]. Las mariposas *H. erato* sometidas a estrés térmico no tuvieron un monitoreo de la temperatura media los días posteriores a las pruebas de estrés térmico, lo que pudo fomentar la variabilidad en la RGE observada entre réplicas biológicas. Por otra parte, se ha demostrado que el ciclo circadiano tiene influencia en la variabilidad de la RGE de mariposas [92]. Se ha probado que diferentes fotoperiodos causan efectos en el ciclo circadiano, lo que afecta la regulación y expresión génica de algunos genes de mariposas *Danaus plexipus* y polillas *Heliothis virescens* [92]. Los fotoperiodos previos a las pruebas térmicas no fueron monitoreados, lo que pudo causar un efecto exacerbante en la variabilidad de RGE de genes *Hsp70*. Además, en este estudio no se eligió una hora determinada para la realización de los tratamientos con diferentes temperaturas, por lo que este factor es otra posible fuente de variabilidad de RGE. Para futuros estudios se recomienda monitorear las condiciones de temperatura de las mariposas 3 días antes y definir una hora fija para los tratamientos térmicos.

4.5.4 Modelos lineales generalizados

Aunque en este estudio se propuso la utilización de modelos lineales generalizados para la interpretación de resultados de RGE por RT-qPCR, existen otros estudios que han incorporado GLM y modelos lineales mixtos para determinar los factores con mayor influencia en la expresión génica. Un ejemplo es el trabajo de Irazábal-González, Wright & Maan en 2021, donde se analiza con modelos lineales mixtos la plasticidad de genes de opsinas en *Pundamilia* basado en un diseño experimental multifactorial [93]. En el caso del presente estudio, a través de modelos lineales generalizados se calcularon los valores paramétricos de la RGE.

El factor de tratamiento por temperatura fue el más influyente en todos los genes SEG de *Hsp70* estudiados (Tabla 5). *Hsp70A* presentó una amplia variabilidad en RGE que fue corroborada con GLMs, demostrándose que todos los factores y sus combinaciones 2 x 2 presentaron valores $P < 0.05$. Otro factor relevante para *Hsp70A* fue el sexo, ya que se observaron valores de RGE superiores en hembras en comparación a los machos estudiados. Finalmente, el factor Tagma tuvo su rol en la variabilidad de este gen, mostrando un patrón de expresión génica descendente para

abdomen, cabeza y tórax tanto en hembras como machos. Los genes *Hsp70B1* y *B2* tuvieron valores de RGE similares entre ellos, pero menores que los observados en *Hsp70A*. Para *Hsp70B1*, el factor que presentó $P < 0.05$ fue únicamente tratamiento y las combinaciones tratamiento:sexo y tratamiento:tagma. Machos y hembras presentaron similitud en los resultados de tratamientos con calor para todas las tagmas, mientras que en la temperatura de 4 °C las hembras presentaron sobre regulación, mientras que los machos mostraron infra regulación. En cuanto al gen *Hsp70B2*, tratamiento, tagma, sexo:tagma y tratamiento:sexo:tagma mostraron valores $P < 0.05$. Se observó que este gen no cumplió el patrón descendente en RGE observado para las tagmas abdomen, cabeza y tórax característico de *Hsp70A* y *Hsp70B1*. Se evidenció que en hembras y machos las muestras del abdomen presentaron mayores niveles de RGE que las de cabeza. Además, la sobre e infra regulación en temperaturas de 4 °C no fue relevante para este gen.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La variabilidad de la expresión genética relativa de genes de la familia *Hsp70* de un único exón en mariposas *Heliconius erato lativitta* fue cuantificada a través de RT-qPCR. El estudio comprendió un modelo experimental multifactorial compuesto por tratamientos térmicos, sexo y tagma. Se identificó sobreexpresión general en los genes *Hsp70A*, *B1* y *B2* en muestras tratadas con temperaturas de 40 °C. Además, se identificó que las tagmas mostraron variabilidad significativa entre sí, siendo abdomen la tagma con mayor expresión génica relativa promedio, seguida de cabeza y tórax. Por otro lado, el sexo fue un factor importante en la expresión génica relativa del gen *Hsp70A*, con valores superiores en hembras frente a machos. Las muestras tratadas con temperaturas de 4 °C presentaron ligera sobreexpresión en *Hsp70A*, mientras que *Hsp70B1* y *B2* tuvieron algunas muestras con sobre e infra expresión, demostrando una ligera plasticidad en genes *Hsp70* de un único exón en temperaturas de shock térmico producidas por frío. Además, se comprobó por modelos lineales generalizados el efecto de cada factor estudiado, siendo la variabilidad de temperatura el factor con mayor influencia en la sobreexpresión de los genes *Hsp70*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Karl I, Sørensen J, Loeschcke V, Fischer K. Karl I, Sørensen JG, Loeschcke V, Fischer K.. HSP70 expression in the Copper butterfly *Lycaena tityrus* across altitudes and temperatures. *J Evol Biol* 22: 172-178. *J Evol Biol.* 2009;22: 172–178. doi:10.1111/j.1420-9101.2008.01630.x
2. Song H, Kemp DB, Tian L, Chu D, Song H, Dai X. Thresholds of temperature change for mass extinctions. *Nature Communications* 2021 12:1. 2021;12: 1–8. doi:10.1038/s41467-021-25019-2
3. Pauls SU, Nowak C, Bálint M, Pfenninger M. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular Ecology.* 2013;22: 925–946. doi:10.1111/MEC.12152
4. Karl I, Michalowsky C, Sørensen JG, Loeschcke V, Fischer K. Effects of rearing and induction temperature on the temporal dynamics of heat shock protein 70 expression in a butterfly. *Physiological Entomology.* 2012;37: 103–108. doi:10.1111/J.1365-3032.2011.00814.X
5. Chown SL, Nicolson S. *Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns.* *Insect Physiological Ecology.* 2004 [cited 3 Aug 2022]. doi:10.1093/ACPROF:OSO/9780198515494.001.0001
6. Heinrich B. *Mechanisms of Insect Thermoregulation. Effects of Temperature on Ectothermic Organisms.* 1973; 139–150. doi:10.1007/978-3-642-65703-0_11
7. Higgins JK, Maclean HJ, Buckley LB, Kingsolver JG. Growth, developmental and stress responses of larvae of the clouded sulphur butterfly *Colias eriphyle* to repeated exposure to high, sub-lethal temperatures. *Physiological Entomology.* 2015;40: 189–195. doi:10.1111/PHEN.12101
8. Hoffmann AA, Sørensen JG, Loeschcke V. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology.* 2003;28: 175–216. doi:10.1016/S0306-4565(02)00057-8
9. Colinet H, Lee SF, Hoffmann A. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *The FEBS Journal.* 2010;277: 174–185. doi:10.1111/J.1742-4658.2009.07470.X
10. Li Z, Srivastava P. Heat-Shock Proteins. *Current Protocols in Immunology.* 2003;58: A.1T.1-A.1T.6. doi:10.1002/0471142735.1MA01TS58
11. Chen B, Feder ME, Kang L. Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses to environmental stress. *Molecular Ecology.* 2018;27: 3040–3054. doi:10.1111/MEC.14769
12. Kiang JG, Tsokos GC. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacology & Therapeutics.* 1998;80: 183–201. doi:https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00028-X
13. Åkerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2010;11: 545–555. doi:10.1038/nrm2938
14. Karlin S, Brocchieri L. Heat Shock Protein 70 Family: Multiple Sequence Comparisons, Function, and Evolution. *Journal of Molecular Evolution* 1998 47:5. 1998;47: 565–577. doi:10.1007/PL00006413
15. Luo S, Chong Wong S, Xu C, Hanski I, Wang R, Lehtonen R. Phenotypic plasticity in thermal tolerance in the Glanville fritillary butterfly. *Journal of Thermal Biology.* 2014;42: 33–39. doi:https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.02.018

16. Luo S, Ahola V, Shu C, Xu C, Wang R. Heat shock protein 70 gene family in the Glanville fritillary butterfly and their response to thermal stress. *Gene*. 2015;556: 132–141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.11.043>
17. Ferguson L, Maroja L, Jiggins C. Convergent, modular expression of ebony and tan in the mimetic wing patterns of *Heliconius* butterflies. *Dev Genes Evol*. 2011;221: 297–308. doi:[10.1007/s00427-011-0380-6](https://doi.org/10.1007/s00427-011-0380-6)
18. Montejo-Kovacevich G, Martin SH, Meier JI, Bacquet CN, Monllor M, Jiggins CD, et al. Microclimate buffering and thermal tolerance across elevations in a tropical butterfly. *Journal of Experimental Biology*. 2020;223. doi:[10.1242/JEB.220426](https://doi.org/10.1242/JEB.220426)
19. Zatsepina OG, Nikitina EA, Shilova VY, Chuvakova LN, Sorokina S, Vorontsova JE, et al. Hsp70 affects memory formation and behaviorally relevant gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress and Chaperones* 2021 26:3. 2021;26: 575–594. doi:[10.1007/S12192-021-01203-7](https://doi.org/10.1007/S12192-021-01203-7)
20. Chen M, Zhang N, Jiang H, Meng X, Qiang K, Wang J. Transcriptional regulation of heat shock protein 70 genes by class I histone deacetylases in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Molecular Biology*. 2020;29: 221–230. doi:[10.1111/IMB.12627](https://doi.org/10.1111/IMB.12627)
21. Azuma M, Ogata T, Yamazoe K, Tanaka Y, Inoue YH. Heat shock cognate 70 genes contribute to *Drosophila* spermatocyte growth progression possibly through the insulin signaling pathway. *Development, Growth & Differentiation*. 2021;63: 231–248. doi:[10.1111/DGD.12734](https://doi.org/10.1111/DGD.12734)
22. Azad P, Zhou D, Russo E, Haddad GG. Distinct mechanisms underlying tolerance to intermittent and constant hypoxia in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*. 2009;4. doi:[10.1371/JOURNAL.PONE.0005371](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0005371)
23. Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, Lingwood CA. Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 1998;66: 4061–4067. doi:[10.1128/IAI.66.9.4061-4067.1998](https://doi.org/10.1128/IAI.66.9.4061-4067.1998)
24. Nazir A, Saxena DK, Kar Chowdhuri D. Induction of hsp70 in transgenic *Drosophila*: Biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2003;1621: 218–225. doi:[10.1016/S0304-4165\(03\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00060-6)
25. Ménoret A, Chaillot D, Callahan M, Jacquin C. Hsp70, an immunological actor playing with the intracellular self under oxidative stress. *International Journal of Hyperthermia*. 2002;18: 490–505. doi:[10.1080/02656730210146926](https://doi.org/10.1080/02656730210146926)
26. Bonaventura R, Poma V, Russo R, Zito F, Matranga V. Effects of UV-B radiation on development and hsp70 expression in sea urchin cleavage embryos. *Marine Biology*. 2006;149: 79–86. doi:[10.1007/S00227-005-0213-0](https://doi.org/10.1007/S00227-005-0213-0)
27. Dimri AP, Kumar P, Maharana P. On the Global Contrasting Temperature-Precipitation Phase Mechanisms in the Last Century. *Journal of Climate Change*. 2021;7: 9–21. doi:[10.3233/JCC210015](https://doi.org/10.3233/JCC210015)
28. Pauls SU, Nowak C, Bálint M, Pfenninger M. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular Ecology*. 2013;22: 925–946. doi:[10.1111/MEC.12152](https://doi.org/10.1111/MEC.12152)
29. Rödder D, Schmitt T, Gros P, Ulrich W, Habel JC. Climate change drives mountain butterflies towards the summits. *Scientific Reports* 2021 11:1. 2021;11: 1–12. doi:[10.1038/s41598-021-93826-0](https://doi.org/10.1038/s41598-021-93826-0)
30. Hill GM, Kawahara AY, Daniels JC, Bateman CC, Scheffers BR. Climate change effects on animal ecology: butterflies and moths as a case study. *Biological Reviews*. 2021;96: 2113–2126. doi:[10.1111/BRV.12746](https://doi.org/10.1111/BRV.12746)
31. Miao BG, Peng YQ, Yang DR, Kubota Y, Economo EP, Liu C. Climate and land-use interactively shape butterfly diversity in tropical rainforest and savanna ecosystems of southwestern China. *Insect Science*. 2021;28: 1109–1120. doi:[10.1111/1744-7917.12824](https://doi.org/10.1111/1744-7917.12824)

32. Stork NE. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348>. 2018;63: 31–45. doi:10.1146/ANNUREV-ENTO-020117-043348
33. de Jong MA, Saastamoinen M. Environmental and genetic control of cold tolerance in the Glanville fritillary butterfly. *Journal of Evolutionary Biology*. 2018;31: 636–645. doi:<https://doi.org/10.1111/jeb.13247>
34. Krebs RA. A comparison of Hsp70 expression and thermotolerance in adults and larvae of three *Drosophila* species. *Cell Stress Chaperones*. 1999;4: 243–249. doi:10.1379/1466-1268(1999)004<0243:acohea>2.3.co;2
35. CALABRIA G, DOLGOVA O, REGO C, CASTAÑEDA LE, REZENDE EL, BALANYÀ J, et al. Hsp70 protein levels and thermotolerance in *Drosophila subobscura*: a reassessment of the thermal co-adaptation hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology*. 2012;25: 691–700. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02463.x>
36. E SO, F SC, null III, J AJ, Eric B, Janine B, et al. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* (1979). 2000;287: 1770–1774. doi:10.1126/science.287.5459.1770
37. Krauss J, Bommarco R, Guardiola M, Heikkinen RK, Helm A, Kuussaari M, et al. Habitat fragmentation causes immediate and time-delayed biodiversity loss at different trophic levels. *Ecology Letters*. 2010;13: 597–605. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01457.x>
38. Stork NE. How many species are there? *Biodiversity & Conservation*. 1993;2: 215–232. doi:10.1007/BF00056669
39. Jiggins C, Lamas G. The Ecology and Evolution of Heliconius Butterflies. 2016. doi:10.1093/acprof:oso/9780199566570.001.0001
40. Arias CF, Giraldo N, McMillan WO, Lamas G, Jiggins CD, Salazar C. A new subspecies in a Heliconius butterfly adaptive radiation (Lepidoptera: Nymphalidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2017;180: 805–818. doi:10.1093/zoolinnean/zlw010
41. Merrill RM, Dasmahapatra KK, Davey JW, Dell'Aglio DD, Hanly JJ, Huber B, et al. The diversification of Heliconius butterflies: what have we learned in 150 years? *Journal of Evolutionary Biology*. 2015;28: 1417–1438. doi:<https://doi.org/10.1111/jeb.12672>
42. Challi RJ, Kumar S, Dasmahapatra KK, Jiggins CD, Blaxter M. Lepbase: the Lepidopteran genome database. *bioRxiv*. 2016; 56994. doi:10.1101/056994
43. FlyBase Gene Report: Dmel\RpS3A. [cited 21 Jun 2022]. Available: <https://flybase.org/reports/FBgn0017545>
44. FlyBase Gene Report: Dmel\EF1α1. [cited 21 Jun 2022]. Available: <https://flybase.org/reports/FBgn0284245>
45. FlyBase Gene Report: Dmel\Gapdh1. [cited 21 Jun 2022]. Available: <http://flybase.org/reports/FBgn0001091.html>
46. FlyBase Gene Report: Dmel\Actin. [cited 21 Jun 2022]. Available: <http://flybase.org/reports/FBgn0286832.html>
47. Attrill H, Falls K, Goodman JL, Millburn GH, Antonazzo G, Rey AJ, et al. FlyBase: establishing a Gene Group resource for *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res*. 2016;44: D786-92. doi:10.1093/nar/gkv1046
48. Geneious | Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis. [cited 4 Jun 2022]. Available: <https://www.geneious.com/>
49. Primer designing tool. [cited 13 Jun 2022]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

50. Joseph Sambrook. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Fourth edition. Green M, editor. Cold Spring Harbor: CSHL press; 2012.
51. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 2010;50: S1–S5. doi:10.1016/J.YMETH.2010.01.005
52. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 2009;55: 611–622. doi:10.1373/CLINCHEM.2008.112797
53. James D, Russell T, Harryman B, Bly C, James T, Seymour L. CITIZEN SCIENTIST TAGGING REVEALS DESTINATIONS OF MIGRATING MONARCH BUTTERFLIES, *DANAUS PLEXIPPUS* (L.) FROM THE PACIFIC NORTHWEST. 2018.
54. Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2006;123: 273–280. doi:10.1016/J.JBIOTEC.2005.11.014
55. Sivaganesan M, Haugland RA, Chern EC, Shanks OC. Improved strategies and optimization of calibration models for real-time PCR absolute quantification. *Water Research*. 2010;44: 4726–4735. doi:10.1016/J.WATRES.2010.07.066
56. Whelan JA, Russell NB, Whelan MA. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*. 2003;278: 261–269. doi:10.1016/S0022-1759(03)00223-0
57. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*. 2001;25: 402–408. doi:10.1006/METH.2001.1262
58. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008 3:6. 2008;3: 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
59. LepBase - Lepidoptera genome browser: *Heliconius erato lativitta* - Summary - Gene: HEL_010335. [cited 14 Jun 2022]. Available: http://ensembl.lepbase.org/Heliconius_erato_lativitta_v1/Gene/Summary?db=core:g=HEL_010335;r=Hel_chr6_4:1592374-1606632;t=HEL_010335-RA
60. LepBase - Lepidoptera genome browser: *Heliconius erato lativitta* - Summary - Gene: HEL_012373. [cited 14 Jun 2022]. Available: http://ensembl.lepbase.org/Heliconius_erato_lativitta_v1/Gene/Summary?db=core:g=HEL_012373;r=Hel_chr3_4:380537-383308;t=HEL_012373-RA
61. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 2010;50: 227–230. doi:10.1016/J.YMETH.2009.11.001
62. Lü J, Yang C, Zhang Y, Pan H. Selection of Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Data in Gene Expression Studies in Insects: A Systematic Review. *Frontiers in Physiology*. 2018;9: 1560. doi:10.3389/FPHYS.2018.01560
63. Yuan M, Lu Y, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, et al. Selection and Evaluation of Potential Reference Genes for Gene Expression Analysis in the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) Using Reverse-Transcription Quantitative PCR. *PLOS ONE*. 2014;9: e86503. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0086503
64. Lu Y, Yuan M, Gao X, Kang T, Zhan S, Wan H, et al. Identification and Validation of Reference Genes for Gene Expression Analysis Using Quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLOS ONE*. 2013;8: e68059. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0068059
65. Ferguson LC, Maroja L, Jiggins CD. Convergent, modular expression of ebony and tan in the mimetic wing patterns of *Heliconius* butterflies. *Development Genes and Evolution*. 2011;221: 297–308. doi:10.1007/S00427-011-0380-6

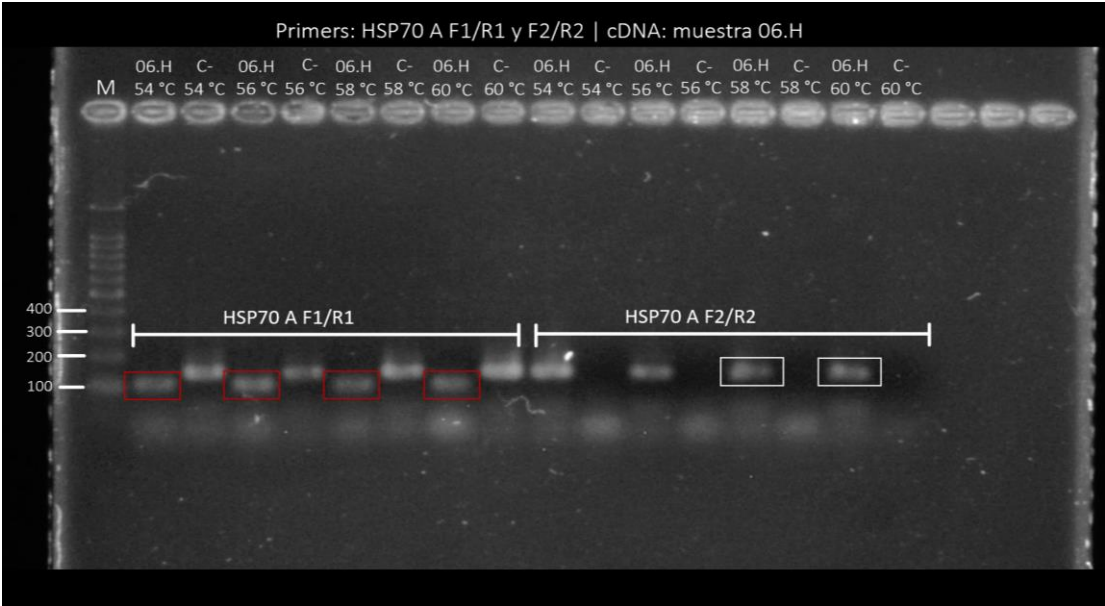
66. Reed RD, McMillan WO, Nagy LM. Gene expression underlying adaptive variation in *Heliconius* wing patterns: non-modular regulation of overlapping cinnabar and vermilion prepatterns. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2007;275: 37–45. doi:10.1098/RSPB.2007.1115
67. Piron Prunier F, Chouteau M, Whibley A, Joron M, Llaurens V. Selection of Valid Reference Genes for Reverse Transcription Quantitative PCR Analysis in *Heliconius numata* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Insect Science*. 2016;16. doi:10.1093/JISESA/IEW034
68. Precision in qPCR | Thermo Fisher Scientific - EC. [cited 9 Jun 2022]. Available: <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-real-time-pcr-information/precision-qpcr.html>
69. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific cebadores for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13: 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134/FIGURES/5
70. BLAST Frequently Asked questions. [cited 5 Jun 2022]. Available: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=FAQ
71. Bochman ML, Paeschke K, Zakian VA. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews Genetics* 2012 13:11. 2012;13: 770–780. doi:10.1038/nrg3296
72. National Center for Biotechnology Information. [cited 13 Jun 2022]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
73. Pérez-Novo CA, Claeys C, Speleman F, van Cauwenberge P, Bachert C, Vandesompele J. Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *Biotechniques*. 2005;39: 52–56. doi:10.2144/05391BM05/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG
74. Working with RNA | Thermo Fisher Scientific - EC. [cited 13 Jun 2022]. Available: <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/rna-extraction/working-with-rna.html>
75. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27: 126–139. doi:10.1016/J.MAM.2005.12.003
76. Chomczynski P. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Research*. 1992;20: 3791. doi:10.1093/NAR/20.14.3791
77. Gambino G, Perrone I, Gribaudo I. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*. 2008;19: 520–525. doi:10.1002/PCA.1078
78. Mlcochova H, Hezova R, Stanik M, Slaby O. Urine microRNAs as potential noninvasive biomarkers in urologic cancers. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2014;32: 41.e1-41.e9. doi:10.1016/J.UROLONC.2013.04.011
79. Lee JE, Kim JH, Hong EJ, Yoo HS, Nam HY, Park O. National Biobank of Korea: Quality control Programs of Collected-human Biospecimens. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2012;3: 185–189. doi:10.1016/J.PHRP.2012.07.007
80. RNasin® Ribonuclease Inhibitor. [cited 7 Jun 2022]. Available: <https://worldwide.promega.com/products/rna-analysis/rnase-inhibitor-rna-protection/rnasin-ribonuclease-inhibitor/?catNum=N2111>
81. Alvarez MJ, Vila-Ortiz GJ, Salibe MC, Podhajcer OL, Pitossi FJ. Model based analysis of real-time PCR data from DNA binding dye protocols. *BMC Bioinformatics*. 2007;8. doi:10.1186/1471-2105-8-85

82. Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AFM. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry*. 2002;307: 63–69. doi:10.1016/S0003-2697(02)00021-0
83. Hawkins PR, Jin P, Fu GK. Full-Length cDNA Synthesis for Long-Distance RT-PCR of Large mRNA Transcripts. <https://doi.org/10.2144/03344st06>. 2018;34: 768–773. doi:10.2144/03344ST06
84. Maan S, Rao S, Maan NS, Anthony SJ, Attoui H, Samuel AR, et al. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. *Journal of Virological Methods*. 2007;143: 132–139. doi:10.1016/J.JVIROMET.2007.02.016
85. Aguet F, Brown AA, Castel SE, Davis JR, He Y, Jo B, et al. Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nature* 2017 550:7675. 2017;550: 204–213. doi:10.1038/nature24277
86. Whitehead A, Crawford DL. Variation in tissue-specific gene expression among natural populations. *Genome Biol*. 2005;6: 1–14. doi:10.1186/GB-2005-6-2-R13/TABLES/2
87. Fu J, Wolfs MGM, Deelen P, Westra HJ, Fehrmann RSN, te Meerman GJ, et al. Unraveling the Regulatory Mechanisms Underlying Tissue-Dependent Genetic Variation of Gene Expression. *PLOS Genetics*. 2012;8: e1002431. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1002431
88. Branquinho MR, Ferreira RTB, Cardarelli-Leite P. Utilização da técnica de PCR em tempo real para avaliação de dois métodos de extração de DNA a partir de alimentos. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 2012;32: 112–118. doi:10.1590/S0101-20612012005000012
89. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2015;3: 9–16. doi:10.1016/J.BDQ.2015.01.005
90. Lalam N. Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. *Journal of Theoretical Biology*. 2006;242: 947–953. doi:10.1016/J.JTBI.2006.06.001
91. Cedraz H, Gromboni JGG, Garcia AAP, Farias Filho RV, Souza TM, de Oliveira ER, et al. Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. *PLOS ONE*. 2017;12: e0186083. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0186083
92. Niepoth N, Ke G, de Roode JC, Groot AT. Comparing Behavior and Clock Gene Expression between Caterpillars, Butterflies, and Moths. *Journal of Biological Rhythms*. 2018;33: 52–64. doi:10.1177/0748730417746458
93. Irazábal-González L, Wright DS, Maan M. Developmental and environmental plasticity in opsin gene expression in Lake Victoria cichlid fish. *bioRxiv*. 2021; 2021.09.01.458542. doi:10.1101/2021.09.01.458542

ANEXOS

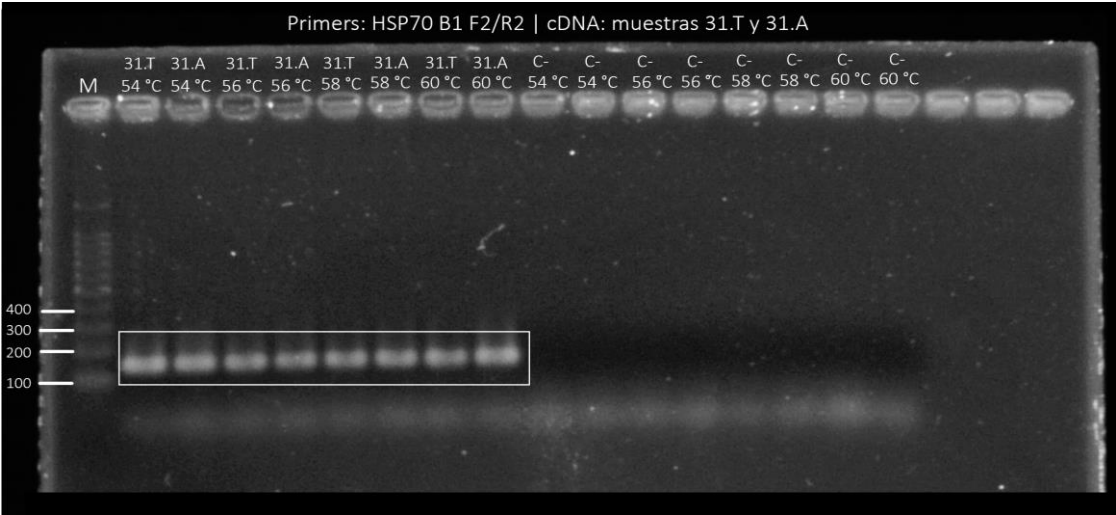
Anexo 1. Gel de electroforesis de productos PCR de cebadores HSP70 A del par 1 y 2 en un gradiente térmico de 54, 56, 58 y 60 °C. A la izquierda se muestran los resultados de PCR convencional del par 1. En color rojo se destacan amplificaciones no esperadas cercanas a 100 pb en los carriles del control negativo. A la derecha se muestran las amplificaciones del par dos, correspondientes al amplicón esperado de 116 pb, de las cuales se seleccionaron las temperaturas 58 y 60 °C como óptimas.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.



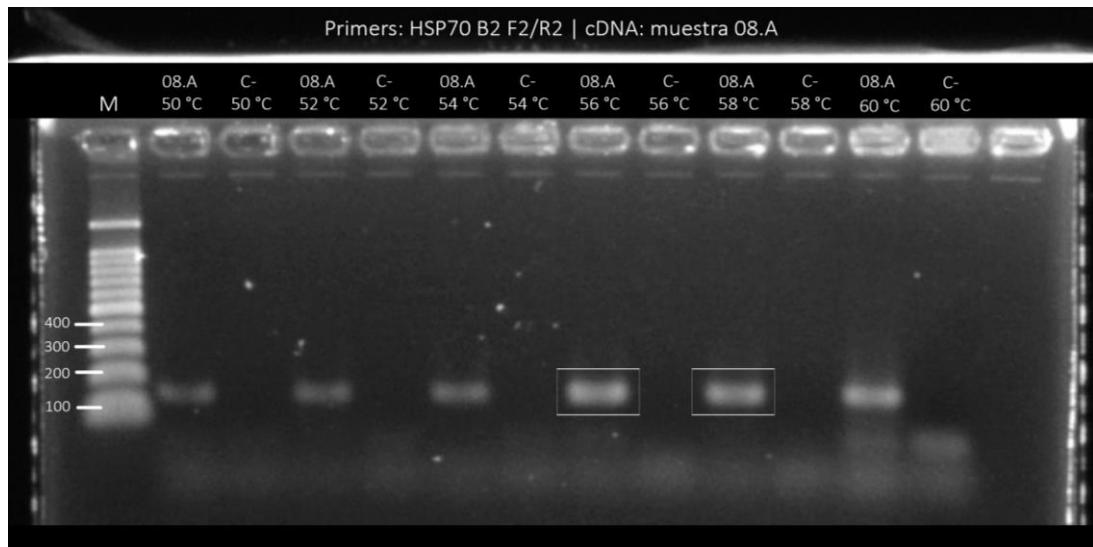
Anexo 2. Gel de electroforesis de productos PCR de cebadores HSP70 B1 del par 2. Se observan amplicones de 150 pb, correspondientes al producto amplificado. Se utilizó un gradiente de temperatura de 54, 56, 58 y 60 °C. Las pruebas con ADNc y controles negativos fueron realizadas por duplicación. Se consideró que todas las temperaturas utilizadas fueron óptimas para la amplificación.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.



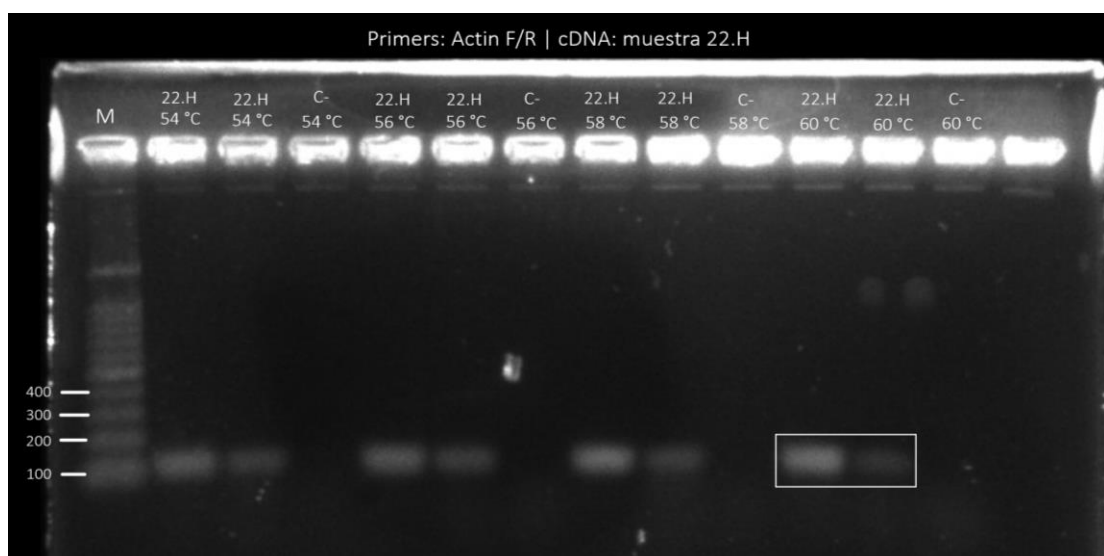
Anexo 3. Gel de electroforesis de productos PCR de cebadores HSP70 B2 del par 2. Se observan amplicones de 150 pb, correspondientes al producto amplificado. El gradiente térmico utilizado fue de 50, 52, 54, 56, 58 y 60 °C. Se eligieron las temperaturas de 56 y 58 °C como las mejores para la producción de amplicones. Los controles positivos fueron acompañados de controles negativos.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

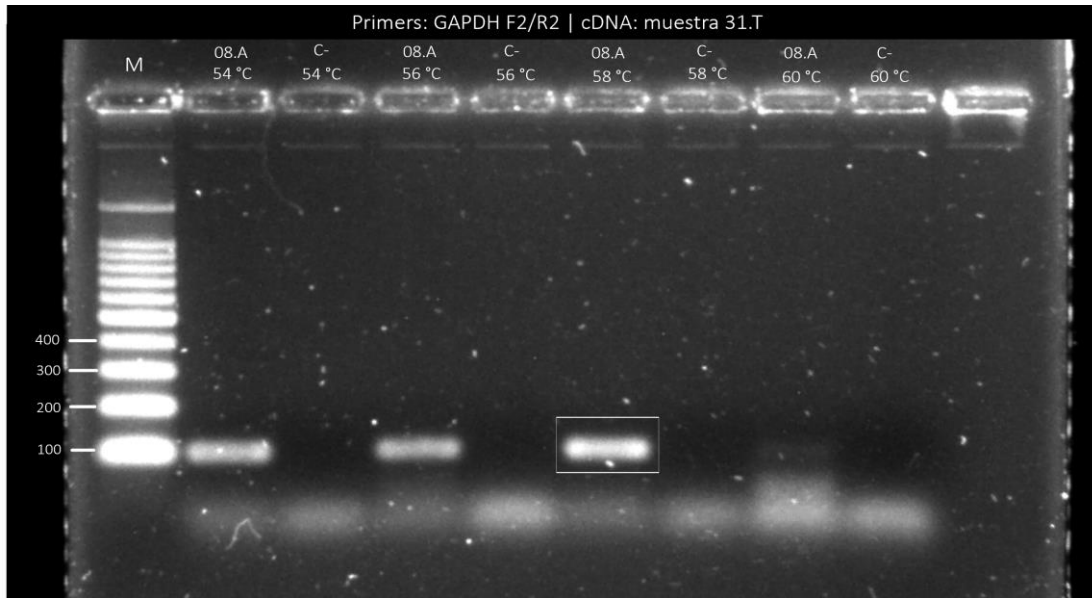


Anexo 4. Gel de electroforesis de productos amplificados por PCR del gen de Actina. Se utilizó un gradiente de 54, 56, 58 y 60 °C. Se realizaron pruebas con concentraciones finales de 10 ng y 2 ng de ADNc por reacción de PCR en controles positivos. Las mejores amplificaciones se dieron entre los 58 y 60 °C.

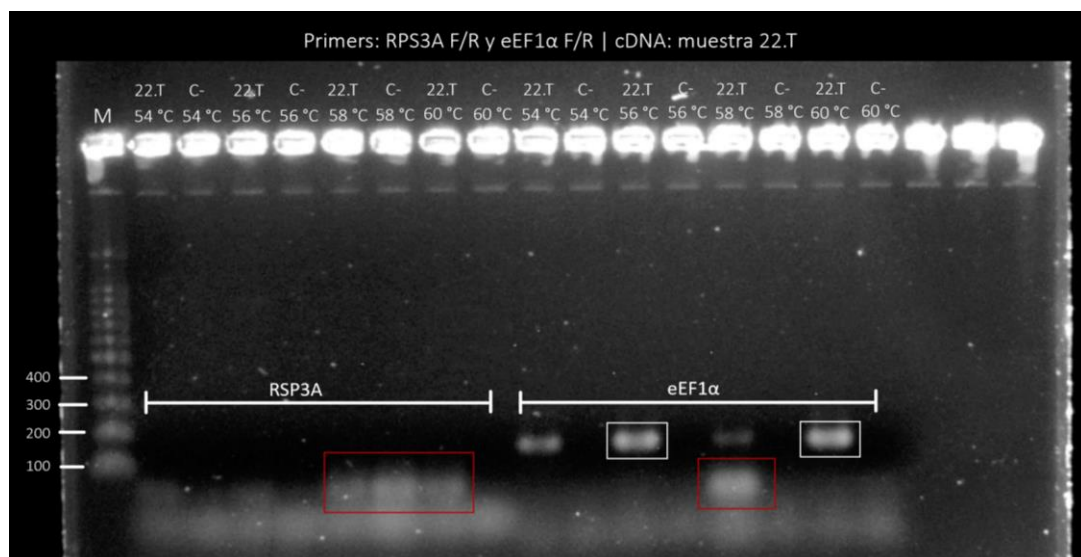
Realizado por: Camino, Leo, 2022.



Anexo 5. Gel de electroforesis de productos amplificados por PCR del gen GAPDH. Se utilizó un gradiente térmico de 54, 56, 58 y 60 °C. La mejor amplificación se observó a los 58 °C, mientras que la peor amplificación se dio a los 60 °C. El producto amplificado fue de 102 pb.
Realizado por: Camino, Leo, 2022.



Anexo 6. Gel de electroforesis. A la izquierda RSP3A y a la derecha eEF1 alfa. No se obtuvieron amplificaciones con cebadores del gen RPS3A. En rojo se pueden observar bandas que muestran productos PCR inferiores a 100 pb cuando el amplicón esperado era de 154 pb, por lo que no se recomienda el uso de este par de cebadores en futuros ensayos. Los cebadores de eEF1a mostraron bandas de tamaño esperado, pero presentaron errores de amplificación en la temperatura de 58 °C, por lo que se descartaron del ensayo.
Realizado por: Camino, Leo, 2022.



Anexo 7. Especificidad cuantificada en *Primer BLAST* para el par 2 de GAPDH.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCGTAGCCAATGTGTCAGT	20	60.04	55.00	3.00	1.00
Reverse primer	TGGTCCATTTCGAGCTTCCT	20	59.89	50.00	5.00	0.00

Products on target templates

>KP073394.1 *Heliconius erato* lativitta voucher WOM03 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) gene, partial cds

product length = 102

Forward primer 1 CCCGTAGCCAATGTGTCAGT 20
Template 433 452

Reverse primer 1 TGGTCCATTTCGAGCTTCCT 20
Template 534 515

Anexo 8. Especificidad cuantificada en *Primer BLAST* para el par de cebadores de EEF1A.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCATTGGACACGTCGACTCC	20	59.76	55.00	6.00	5.00
Reverse primer	GTCCAACACACCAGGCGTAT	20	60.32	55.00	5.00	5.00

Products on target templates

>KP113998.1 *Heliconius erato* lativitta voucher WOM03 elongation factor 1 alpha (Ef1a) gene, partial cds

product length = 150

Forward primer 1 TCATTGGACACGTCGACTCC 20
Template 1 -----. 15

Reverse primer 1 GTCCAACACACCAGGCGTAT 20
Template 144 126

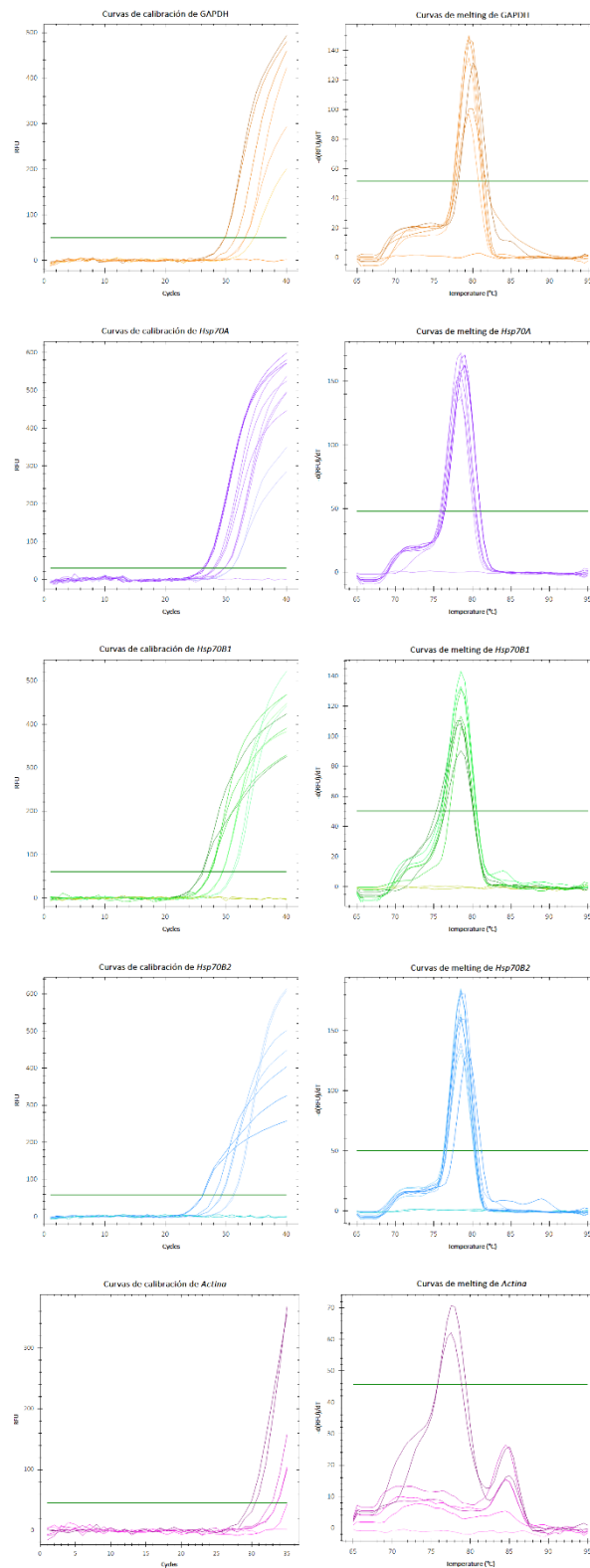
product length = 149

Forward primer 1 TCATTGGACACGTCGACTCC 20
Template 1 -----. 15

Reverse primer 1 GTCCAACACACCAGGCGTA-T 20
Template 144T. 125

Anexo 9. Curvas de calibración y de melting de los cebadores.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.



Anexo 10. Cuantificación de concentraciones de ARN de *H. erato*.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

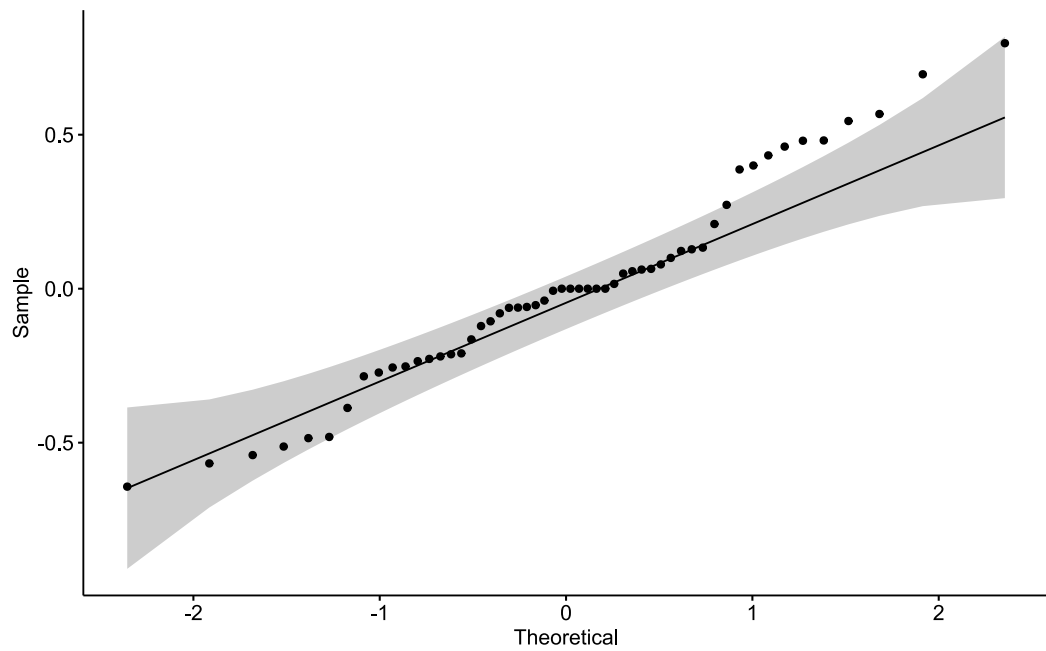
Muestra	ID organismo	Tagma	Tratamiento	Sexo	Con (ng/ μ L)	A260/280	A260/230
1	01.H	H	Frío	Hembra	273.7	2.04	1.8
2	01.T	T	Frío	Hembra	338.7	2.14	1.78
3	01.A	A	Frío	Hembra	256.9	2.04	1.82
4	02.H	H	Frío	Hembra	323.1	2.03	1.76
5	02.T	T	Frío	Hembra	506.5	2.21	1.77
6	02.A	A	Frío	Hembra	209	1.22	1.45
7	03.H	H	Frío	Hembra	534.9	2.01	1.66
8	03.T	T	Frío	Hembra	101.1	2.12	1.83
9	03.A	A	Frío	Hembra	167.8	1.78	1.82
10	04.H	H	Control	Hembra	37.3	1.93	1.17
11	04.T	T	Control	Hembra	161.9	2.17	2.02
12	04.A	A	Control	Hembra	313	1.99	1.64
13	05.H	H	Control	Hembra	65.7	1.99	1.87
14	05.T	T	Control	Hembra	85.5	2.11	1.75
15	05.A	A	Control	Hembra	419.5	2.15	1.81
16	06.H	H	Control	Hembra	81.7	1.95	0.87
17	06.T	T	Control	Hembra	22.1	1.92	1.88
18	06.A	A	Control	Hembra	146.6	1.92	1.87
19	07.H	H	Control	Hembra	200.5	2.02	1.48
20	07.T	T	Control	Hembra	331	2.2	2.15
21	08.H	H	Frío	Macho	252.8	1.92	2.1
22	08.T	T	Frío	Macho	190.6	2.19	1.98
23	08.A	A	Frío	Macho	93.3	2.08	1.55
24	09.H	H	Frío	Macho	412.5	2.09	1.76
25	09.T	T	Frío	Macho	325.6	2.21	2.24
26	09.A	A	Frío	Macho	366.2	2.11	2.17
27	10.H	H	Frío	Macho	84.9	1.97	1.72
28	10.T	T	Frío	Macho	85.6	2.06	1.87
29	10.A	A	Frío	Macho	122.6	1.98	1.78
30	11.T	T	Control	Hembra	330.4	2.23	2.08
31	11.A	A	Control	Hembra	360.4	2.16	2.23
32	12.H	H	Control	Macho	306.1	2.08	1.99
33	12.T	T	Control	Macho	689.1	2.21	1.91
34	12.A	A	Control	Macho	142.6	1.59	1.61

Muestra	ID organismo	Tagma	Tratamiento	Sexo	Con (ng/μL)	A260/280	A260/230
35	13.H	H	Control	Macho	518.9	2.11	1.88
36	13.T	T	Control	Macho	476.9	2.25	1.97
37	13.A	A	Control	Macho	251	2.13	1.65
38	14.H	H	Control	Macho	510.5	2.03	2.08
39	14.T	T	Control	Macho	335.1	2.24	1.85
40	14.A	A	Control	Macho	743.4	2.19	2.01
41	15.H	H	Calor	Macho	36.3	2.23	1.81
42	15.T	T	Calor	Macho	60.1	2.25	1.59
43	15.A	A	Calor	Macho	108.8	2.13	1.95
44	16.H	H	Calor	Macho	121.7	2.18	1.91
45	16.T	T	Calor	Macho	83.5	2.2	1.8
46	16.A	A	Calor	Macho	109	2.21	1.91
47	17.H	H	Calor	Hembra	437.4	2.13	1.89
48	17.T	T	Calor	Hembra	240.7	2.23	2.06
49	17.A	A	Calor	Hembra	235.2	2.12	2.21
50	18.H	H	Calor	Hembra	263.2	2.09	1.72
51	18.T	T	Calor	Hembra	254.8	2.21	1.88
52	18.A	A	Calor	Hembra	506.1	2.05	2.22
53	19.H	H	Calor	Hembra	104	2.2	1.19
54	19.T	T	Calor	Hembra	67.6	2.18	1.88
55	19.A	A	Calor	Hembra	371.9	2.19	1.69
56	20.H	H	Calor	Hembra	699.8	2.1	1.78
57	20.T	T	Calor	Hembra	573.9	2.03	2.14
58	21.H	H	Calor	Macho	132.9	2.15	1.85
59	21.T	T	Calor	Macho	64	2.18	1.84
60	21.A	A	Calor	Macho	256	2.19	1.97
61	22.H	H	Calor	Hembra	125	2.18	1.43
62	22.T	T	Calor	Hembra	102.9	2.24	1.27
63	22.A	A	Calor	Hembra	212.4	2.14	1.63
64	23.H	H	Calor	Macho	143.1	2.19	2.28
65	23.T	T	Calor	Macho	145.4	2.23	1.87
66	23.A	A	Calor	Macho	120.5	2.18	1.26
67	24.H	H	Calor	Macho	472	2.13	1.77
68	24.T	T	Calor	Macho	301.6	2.22	2.01
69	24.A	A	Calor	Macho	1003.8	2.15	2.26

Muestra	ID organismo	Tagma	Tratamiento	Sexo	Con (ng/μL)	A260/280	A260/230
70	25.H	H	Calor	Macho	253.6	2.15	1.96
71	25.T	T	Calor	Macho	517.4	2.24	1.83
72	25.A	A	Calor	Macho	678.9	2.16	1.73
73	26.H	H	Calor	Macho	456	2.13	1.99
74	26.T	T	Calor	Macho	454.1	2.23	2.06
75	26.A	A	Calor	Macho	417.8	2.15	2.16
76	27.H	H	Calor	Hembra	683.2	2.06	1.72
77	27.T	T	Calor	Hembra	532.4	2.2	1.71
78	27.A	A	Calor	Hembra	456.6	2.18	1.78
79	28.H	H	Calor	Hembra	213.4	2.08	1.7
80	28.T	T	Calor	Hembra	700.3	2.24	2.13
81	28.A	A	Calor	Hembra	269.5	2.02	1.9
82	29.H	H	Calor	Macho	459.1	2.09	1.9
83	29.T	T	Calor	Macho	519.1	2.2	2.38
84	29.A	A	Calor	Macho	447.3	1.9	2.13
85	30.H	H	Calor	Hembra	283.5	2.07	1.58
86	30.T	T	Calor	Hembra	557.4	2.22	2.49
87	30.A	A	Calor	Hembra	284.4	2.09	2.25
88	31.H	H	Calor	Hembra	521.9	2.08	1.67
89	31.T	T	Calor	Hembra	762.5	2.21	2.11
90	31.A	A	Calor	Hembra	247.9	2.12	2.1
91	32.H	H	Calor	Macho	708.8	2.07	1.66
92	32.T	T	Calor	Macho	802.7	2.22	2.09
93	32.A	A	Calor	Macho	397.5	2.15	2.27
Promedio					324.24	2.11	1.86
SD					212.05	0.14	0.27

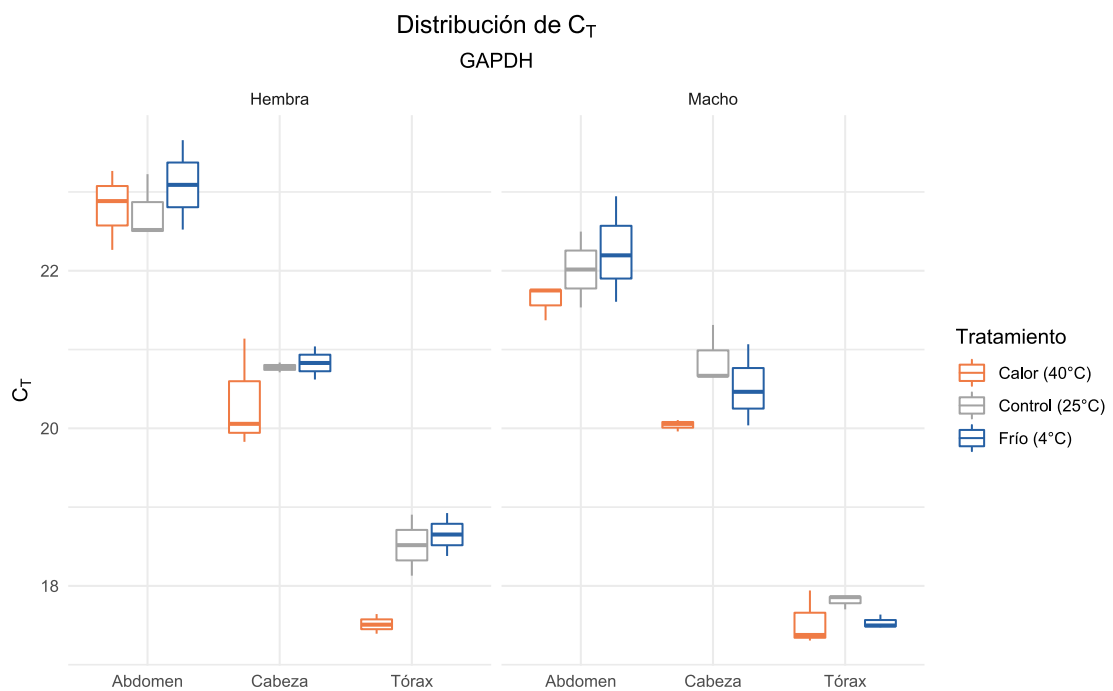
Anexo 11. Gráfica Q-Q de valores residuales de CT de GAPDH.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.



Anexo 12. Ciclos de umbral de GAPDH con factores tratamiento, sexo y tagma (3x3x2).

Realizado por: Camino, Leo, 2022.



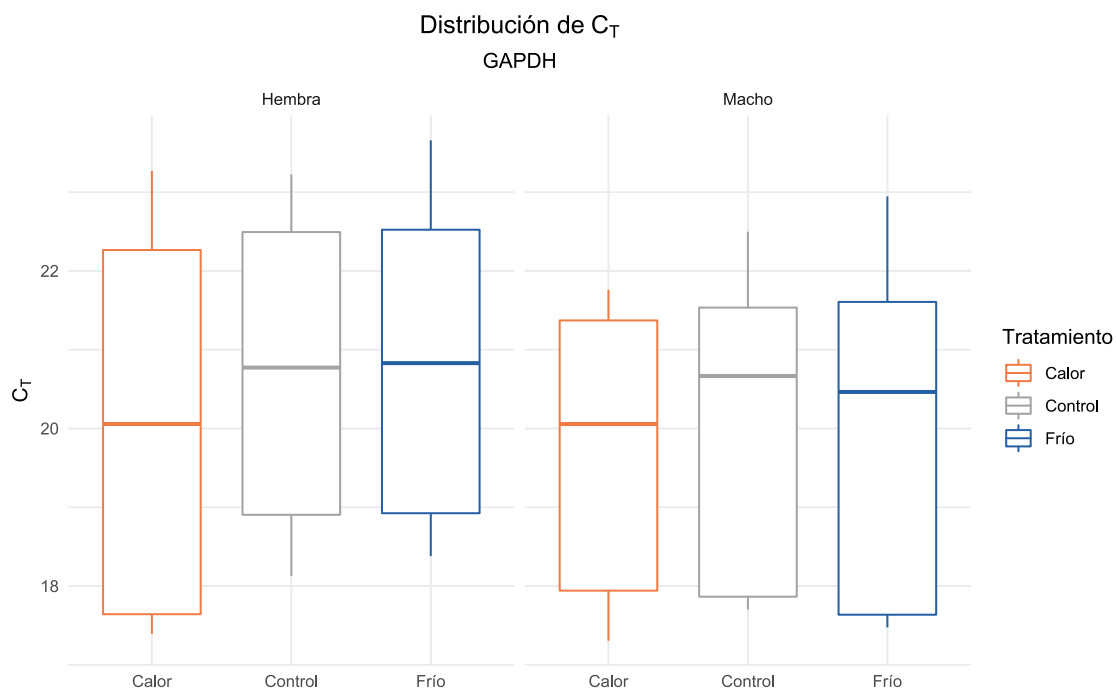
Anexo 13. Resultados del ANOVA factorial (3x3x2) de CT de GAPDH.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

Factor	DFn	DFd	F	p	p < 0.05	ges
Sexo	1	36	27.203	7.76E-06	*	0.43
Tagma	2	36	587.921	3.25E-28	*	0.97
Tratamiento	2	36	9.232	0.00058	*	0.34
Sexo:Tagma	2	36	4.076	0.03	*	0.19
Sexo:Tratamiento	2	36	0.823	0.45		0.04
Tagma:Tratamiento	4	36	0.844	0.51		0.09
Sexo:Tagma:Tratamiento	4	36	1.733	0.16		0.16

Anexo 14. Ciclos de umbral de GAPDH con factores tratamiento y sexo (3x2).

Realizado por: Camino, Leo, 2022.



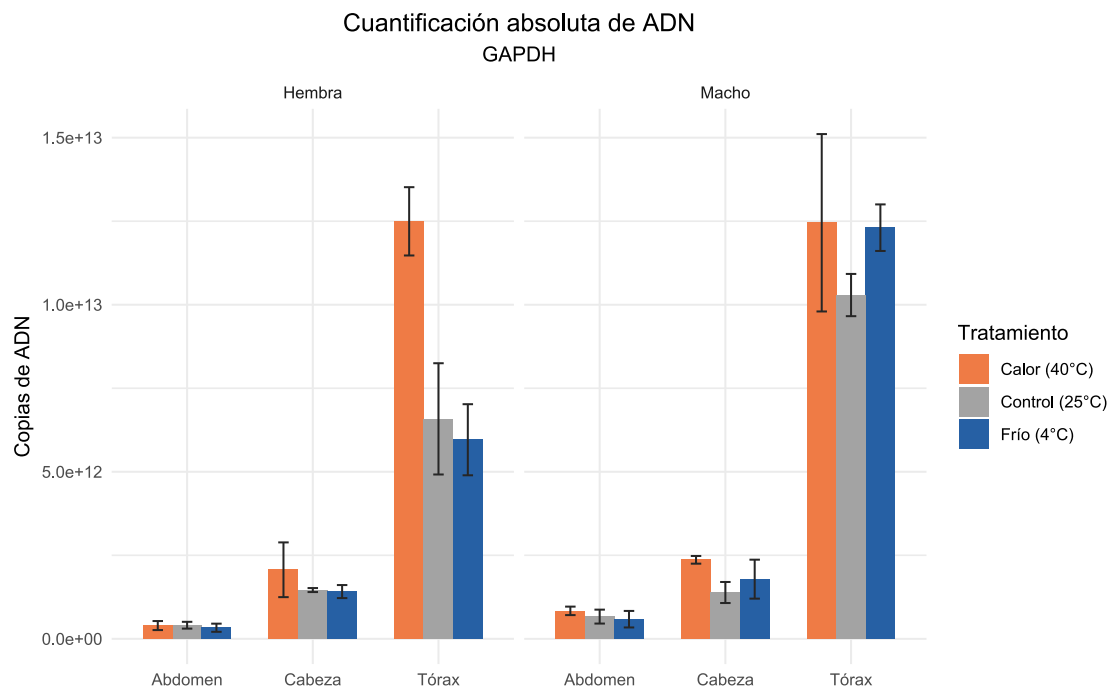
Anexo 15. Resultados del ANOVA factorial (3x2) de CT de GAPDH excluyendo tagma.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

Factor	DFn	DFd	F	p	p < 0.05	ges
Sexo	1	48	1.061	0.308		0.022
Tratamiento	2	48	0.36	0.699		0.015
Sexo:Tratamiento	2	48	0.032	0.968		0.001

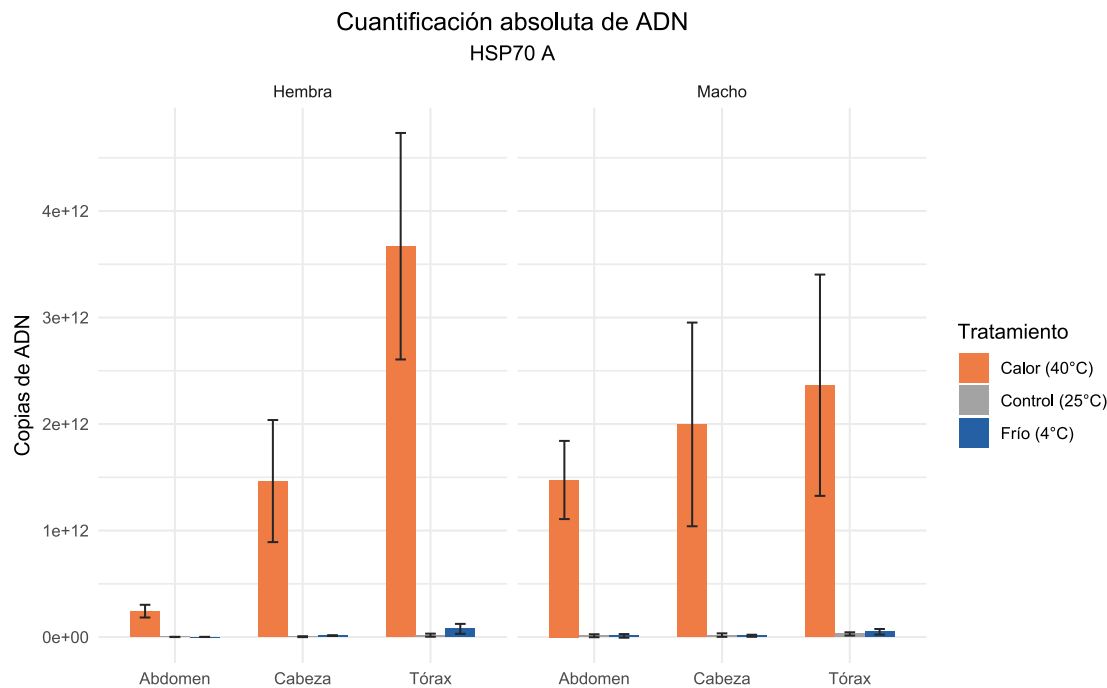
Anexo 16. Cuantificación absoluta del gen endógeno *GAPDH*.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.



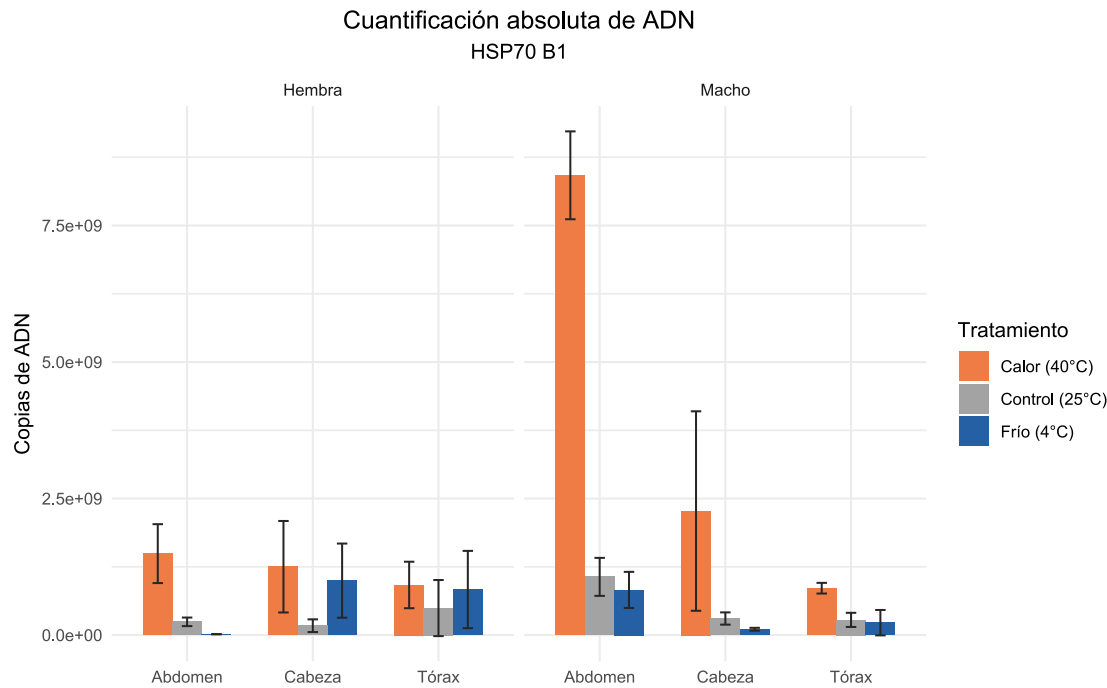
Anexo 17. Cuantificación absoluta del *Hs70 A*.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.



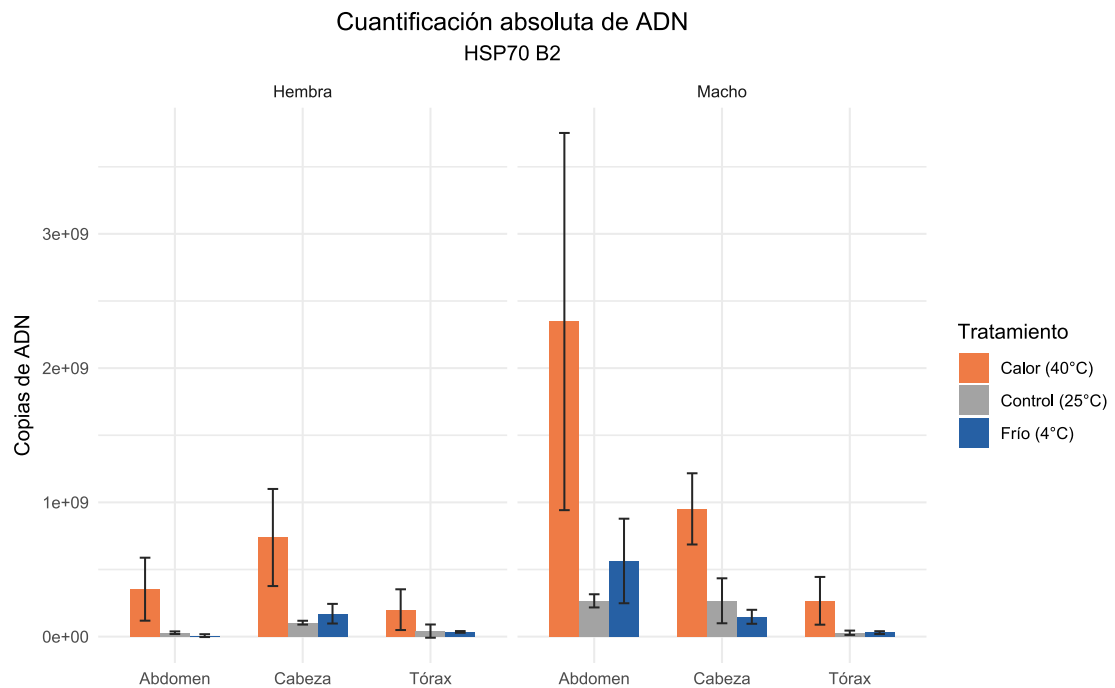
Anexo 18. Cuantificación absoluta del *Hsp70 B1*.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.



Anexo 19. Cuantificación absoluta del *Hsp70 B2*.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.



Anexo 20. Resultados de RT-qPCR para la cuantificación de genes *hsp70*. Naranja:

GAPDH, Púrpura: *Hsp70 A*, Verde: *Hsp70 B1*, Azul: *Hsp70 B2*.

Realizado por: Camino, Leo, 2022.

